

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

**E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA**

**Falla de transferencia pasiva de inmunoglobulina G y  
su asociación con mortalidad por enterotoxemia en  
alpacas neonatas**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

**AUTOR**

Jorge Enrique MAXIMILIANO GUERRA

**ASESOR**

Raúl ROSADIO ALCÁNTARA

Lima - Perú

2014




UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

## *Facultad de Medicina Veterinaria*

ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

*Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 072-EAPMV/FMV-2014*

PRESIDENTE :

  
HERMELINDA RIVERA GERÓNIMO

MIEMBROS :

  
RAÚL ROSADIO ALCÁNTARA  
Asesor de la Tesis

  
VÍCTOR LEYVA VALLEJOS

  
ALBERTO MANCHEGO SAYÁN

San Borja, 30 de abril de 2014

Vº Bº

  
MV. DIEGO DÍAZ COAHILA  
Director de la Escuela Académico Profesional de  
Medicina Veterinaria





## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el auditorio principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día miércoles **30 de Abril del 2014**, a las **11:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° **072-EAPMV/FMV-2014**, integrado por los siguientes profesores:

<b>HERMELINDA RIVERA GERÓNIMO</b>	Presidente del Jurado
<b>RAÚL ROSADIO ALCÁNTARA</b>	Asesor de la Tesis
<b>VÍCTOR LEYVA VALLEJOS</b>	Miembro del Jurado
<b>ALBERTO MANCHEGO SAYÁN</b>	Miembro del Jurado

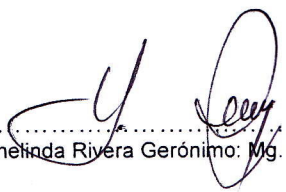
Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **MAXIMILIANO GUERRA, JORGE ENRIQUE**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:


### **“FALLA DE TRANSFERENCIA PASIVA DE INMUNOGLOBULINA G Y SU ASOCIACIÓN CON MORTALIDAD POR ENTEROTOXEMIA EN ALPACAS NEONATAS”**


ego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECISIETE ( 17 )**.

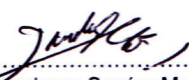
Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **12:30 Horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuádruplicado los integrantes del Jurado:

  
Hermelinda Rivera Gerónimo: Mg. Prof. Principal, D.E.

  
Raúl Rosadio Alcántara: PhD. Prof. Principal, T.C.

  
Víctor Leyva Vallejos: PhD. Prof. Principal, D.E.

  
Alberto Manchego Sayán: Mg. Prof. Principal, D.E.



A Gregorio y Juana, mis padres, lo mejor que tengo, les dedico esta tesis por todo su esfuerzo, confianza y paciencia al entenderme en este camino de la Investigación. A la memoria de mi Abuelo Lorenzo, la persona más íntegra y buena que conocí, gracias.

## **AGRADECIMIENTOS**

Totales agradecimientos a los doctores Raúl Rosadio Alcántara y Lenin Maturrano Hernández, por la confianza depositada en mí para realizar la presente tesis.

Al Centro de Investigación y Producción La Raya-Puno, de la Universidad del Altiplano, a las comunidades alpaqueras en Cusco y Puno, por las facilidades brindadas en el transcurso del muestreo.

A Hugo Castillo Doloriert por los consejos y apoyo constante, tanto en la parte teórica como práctica, gracias amigo.

A Karol Guzmán, Anthony Rodríguez, Nidia Puray, Julio Tafur y Rose Zarate por su gran apoyo en la toma de muestras.

A Paloma Krüger, David Pérez, Luis Luna y Juan Manuel Aguilar por su ayuda en la parte de procesamiento de muestra, mis sinceras gracias.

A Jesús Lezcano, un gran amigo, por su análisis objetivo de la tesis y los consejos en muchos aspectos, te portaste como un verdadero amigo, gracias.

A los compañeros del Laboratorio: Nataly Allasi, Raquel Hurtado, Daniel Fernández, Álvaro Veliz, Rocío Rímac y Andrea Soto por lo ameno que fue estar en el laboratorio.

A las pequeñas crías que fueron parte del proyecto, sin ellas no se hubiera llevado a cabo el estudio, gracias donde quiera que se encuentren.

## INDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>IV</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>V</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE CUADROS.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>I. INTRODUCCION .....</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES .....</b>	<b>3</b>
1. <i>LA ALPACA Y LA SITUACION ALPAQUERA DEL PERÚ .....</i>	<i>3</i>
2. <i>PLACENTACION EN LA ALPACA.....</i>	<i>5</i>
3. <i>ASPECTOS INMUNOLOGICOS.....</i>	<i>7</i>
3.1 Desarrollo fetal del Sistema Inmunitario.....	7
3.2 Respuesta Inmune de los Animales Recién Nacidos. ....	9
3.3 Transferencia de Inmunidad de la Madre a la Descendencia. ....	11
3.4 Secreción y composición del Calostro.....	12
3.5 Inmunoglobulina G .....	13
3.6 Absorción Del Calostro.....	15
3.7 Falla de Transferencia Pasiva.....	20
3.7.1 Falla en la Producción.....	25
3.7.2 Falla en la Ingestión.....	25
3.7.3 Falla en la Absorción.....	25
4. <i>ENTEROTOXEMIA.....</i>	<i>26</i>
4.1 Etiología. ....	26
□ Tipificación. ....	28
□ Toxinas Principales .....	29
a. Toxina alfa ( $\alpha$ ) .....	29
b. Toxina beta ( $\beta$ ).....	30
c. Toxina épsilon ( $\epsilon$ ) .....	31
d. Toxina iota ( $\iota$ ) .....	31
e. Enterotoxina del <i>C. perfringens</i> : CPE .....	31
4.2 Epidemiología. ....	33
□ Factores relacionados al huésped: .....	34

□ Factores relacionados al medio ambiente:.....	34
4.3 Patogenia.....	35
4.4 Signos Clínicos.....	37
4.5 Lesiones Anatomopatológicas.....	38
4.6 Lesiones Histopatológicas.....	40
4.7 Diagnóstico de laboratorio.....	41
4.8 Tratamiento.....	42
4.9 Control.....	42
4.10 Prevención.....	43
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
1. <i>Fase I: Estandarización de la Curva de Cinética de degradación de inmunoglobulina G</i> .....	45
1.1 Lugar de ejecución:.....	45
1.2 Animales: .....	45
1.3 Procedimiento de muestreo .....	46
1.4 Procesamiento de Muestra .....	46
1.5 Análisis estadístico:.....	48
2. <i>Fase II: Animales Sanos y Muertos por Enterotoxemia (Casos y Controles)</i> .....	48
2.1 Lugar de ejecución:.....	48
2.2 Animales: .....	49
2.3 Tamaño de muestra para Estudio Caso - Control .....	50
2.4 Procedimiento de muestreo .....	51
2.5 Cuantificación de Inmunoglobulina G.....	51
2.6 Análisis estadístico.....	52
□ Análisis de datos por Regresión Exponencial: .....	52
□ Estudio para la estimación de asociación: (Estudio tipo Caso control).....	52
3. <i>Equipo y material para el trabajo de campo</i> .....	53
4. <i>Equipo y material para el trabajo de laboratorio</i> .....	53
IV. RESULTADOS .....	55
1. <b><i>Fase I: Ecuación de la curva de cinética de Degradación de la IgG en Alpacas Neonatas</i></b> .....	55

<b>2. Fase II: Casos y Controles .....</b>	<b>59</b>
<b>2.1 Fase Final: Determinación de la asociación entre FTP y</b>	
<b>Enterotoxemia .....</b>	<b>64</b>
V. DISCUSION .....	66
VI. CONCLUSIONES.....	70
VII. RECOMENDACIONES.....	71
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	72
IX. ANEXOS .....	80



## RESUMEN

La enterotoxemia es una de las enfermedades que causa alta tasa mortalidad en crías de alpacas durante las primeras semanas de vida. Es causada principalmente por el *Clostridium perfringens* tipo A. Diversos estudios sugieren como factor desencadenante a la Falla de Transferencia Pasiva (FTP) de Inmunoglobulina G (IgG). El presente estudio tuvo como finalidad determinar la asociación entre FTP y la mortalidad por enterotoxemia en alpacas neonatas. La toma de muestras se realizó en comunidades y centro de producción de los departamentos de Cusco y Puno. Se realizó la cuantificación de niveles de IgG de 17 animales casos y 26 controles usando el test de Inmunodifusión Radial (IDR) mediante el método de Mancini y se confrontó con una curva estándar de cinética de degradación de IgG en crías de alpaca normales. Mediante la prueba de Odds Ratio se determinó que no hay una asociación estadísticamente significativa entre FTP y Enterotoxemia.

Palabras Claves: Falla de Transferencia Pasiva, Inmunoglobulina G, Inmunodifusión Radial, Enterotoxemia, Alpacas Neonatas.

## **SUMMARY**

Enterotoxemia is a disease that causes high mortality rate in young alpacas during the first weeks of life. It is mainly caused by *Clostridium perfringens* type A. Studies suggest as a trigger to Failure of Passive Transfer (FTP) Immunoglobulin G (IgG) factor. This study aimed to determine the association between FTP and mortality in newborn alpacas by enterotoxemia. Sampling was conducted in communities and production center of the departments of Cusco and Puno. Quantifying IgG levels of 17 cases and 26 controls animals using the Radial immunodiffusion test (IDR) by the method of Mancini and is confronted with a standard curve of IgG degradation kinetics in normal young alpaca was performed. By testing Odds Ratio was determined that there is no statistically significant association between FTP and Enterotoxemia.

**Keywords:** Failure of Passive Transfer, Immunoglobulin G, Enterotoxemia, Neonatal Alpaca.

## **ABREVIATURAS**

- FTP: Falla de Transferencia Pasiva.
- IgG: Inmunoglobulina G.
- CSA: Camélidos Sudamericanos.
- OR: Odds Ratio
- IDR: Inmunodifusión Radial.

## LISTA DE CUADROS

- **Cuadro 1:** Clasificación de tipos de *C. perfringens* en base a la presencia de sus cuatro toxinas. ....29
- **Cuadro 2.** Tabla 2x2 utilizado para el Odds Ratio. .... 53
- **Cuadro 3.** Resultados de las concentraciones (mg/dl) de IgG por día en crías de alpacas. ....55
- **Cuadro 4.** Grupo Casos (Enterotoxemia positivo), donde se observan la edad, código de muestra, lugar de muestreo, el año de muestreo, el número de diámetro en placa y concentración de IgG. ....60
- **Cuadro 5.** Grupo controles (Enterotoxemia negativo), donde se observan la edad, código de muestra, lugar de muestreo, el año de muestreo, el número de diámetro en placa y concentración de IgG. ....62
- **Cuadro 6.** Los resultados siendo enfrentados en el cuadro para su posterior análisis estadístico mediante Odds Ratio. ....64

## LISTA DE FIGURAS

- **Figura 1.** Alpacas pastoreando en la localidad de Macussani-Puno. 2007. (CONOPA) ..... 4
- **Figura 2.** Proceso de Absorción de Inmunoglobulinas en el intestino..... 17
- **Figura 3.** Curva teórica de la caída de las concentraciones séricas de IgG en crías de llama y alpaca (Weaver *et al.*, 2000a) ..... 23
- **Figura 4.** La media de concentración de IgG en crías de 15 llamas y 15 alpacas desde el nacimiento (Tiempo 0) hasta los 60 días de edad (Bravo y Garnica, 1997) ..... 24
- **Figura 5.** Animal con evidente sintomatología nerviosa (opistótonos). Macusani 2007. (CONOPA)..... 38
- **Figura 6.** Necropsia de una cría con aparente enterotoxemia. Macusani 2007. (CONOPA) .....39
- **Figura 7.** Kit de Inmunodifusión Radial (IDR) para Inmunoglobulina G (IgG) de camélido, nótese los halos de precipitación de cada pocillo indicando la concentración de IgG de cada muestra. 2010.....47
- **Figura 8.** Curva de dispersión de las concentraciones de IgG en 6 crías de alpacas desde los dos hasta los 21 días de edad.....66
- **Figura 9.** Curva de Degradación de la Concentración de Ig G en suero de Alpacas Neonatas mostrando concentraciones de Ig G por días de edad, basado en la ecuación obtenida en la figura N° 8.....58
- **Figura 10:** Animales Casos (Muertos por enterotoxemia) confrontados con la Curva de Degradación de IgG en suero de alpacas neonatas por día de edad.....61
- **Figura 11:** Animales control (animales sobrevivientes a brotes de enterotoxemia) enfrentados con la Curva de Degradación de IgG en suero de alpacas neonatas por día de edad.....63

## I. INTRODUCCION

La producción alpaquera es una de las actividades pecuarias de mayor importancia de las zonas altoandinas. La alpaca, uno de los cuatro camélidos sudamericanos que habitan en los andes, es una de las especies mejor adaptada a las inclemencias de esa región (Garnica y Bravo, 2001).

La producción alpaquera sufre varios problemas, uno de los cuales, la enterotoxemia, causada por el *Clostridium perfringens*, es considerada una de las más importantes debido a las cuantiosas pérdidas económicas dada a su alta tasa de mortalidad en crías llegando incluso a un 70% de la población de crías (Ramírez *et al.*, 1985; Ameghino y De Martini, 1991).

Las alpacas, deben ingerir el calostro, debido a la característica epiteliocorial de la placenta, nacen con nulos títulos de anticuerpos, por lo que es necesario la ingesta de calostro, la primera leche de la madre, que contiene grandes cantidades de anticuerpos, en especial IgG, necesarios para la obtención de cierto grado de protección contra agentes microbiológicos presentes en su medio ambiente (Garmendia *et al.*, 1986). Si por diversas razones la cría no ingiere las cantidades suficientes de IgG, el animal padece de Falla de Transferencia Pasiva (FTP) de IgG (Garmendia *et al.*, 1986; Tizard, 2009)

El evento fisiológico conocido como Falla de Transferencia Pasiva (FTP) de Inmunoglobulina G (IgG) es otro de los problemas en esta actividad que lleva años siendo investigado. Weaver *et al.* (2000a) consideraba la incidencia de FTP entre 9 y 20% del total de la población. Garnica y Bravo (2001) consideraban un 15% del total de nacidos con casos de FTP. Garmendia *et al.* (1986) encontró un 9% de prevalencia de FTP. En los estudios antes mencionados, se establecieron a los animales con valores séricos de IgG menores a los 1000mg/dl como indicativo de FTP, debido a una mayor casuística de mortalidad en animales neonatos con estos valores de concentraciones de IgG sérica. Garmendia *et al.* (1986) por su lado determinó que individuos con niveles séricos menores a los 900mg/dl como animales con FTP, con el mismo criterio de un alto índice de mortalidad en animales que presenten valores menores a esta concentración.

Durante años se hicieron estudios sobre la enterotoxemia llegando a un punto donde puede relacionarse el estatus inmunológico con un aumento en la Tasa de mortalidad (Garmendia *et al.*, 1986), pero no específicamente enterotoxemia, tema que aún no ha sido esclarecido.

El presente estudio tuvo por finalidad dilucidar la posible asociación entre la FTP y la mortalidad por enterotoxemia en alpacas neonatas. Bajo esa premisa se desarrolló el estudio en dos fases, la primera fase utilizó muestras séricas obtenidas, progresivamente a partir de las 48 horas hasta los 21 días de edad, de seis animales saludables, para obtener una ecuación de la curva de degradación de IgG, mediante la prueba serológica conocida como Inmunodifusión radial. La segunda fase del estudio utilizó muestras de sangre de 17 animales que murieron por enterotoxemia y 26 animales saludables que habían resistido el brote de la enfermedad. Estos resultados fueron utilizados para ser comparados con los datos obtenidos en la primera fase del estudio, con el fin de encontrar una posible asociación mediante la prueba de Odds Ratio.

## **II. ANTECEDENTES**

### **1. LA ALPACA Y LA SITUACION ALPAQUERA DEL PERÚ**

La alpaca es una de las cuatro especies de camélidos sudamericanos que se encuentran en nuestro país, las cuales son miembro de la tribu lamini, familia *camelidae*, suborden tylopoda, orden artiodactyla y clase mammalia. Tradicionalmente los camélidos sudamericanos son parte importante dentro de la economía de comunidades campesinas altoandinas, al proveer a éstas de carne y fibra. (Wheeler, 1995). La alpaca es uno de los camélidos sudamericanos domésticos mejor adaptados a la región de los andes del Perú. Su crianza prospera en condiciones de alimentación basadas en el consumo de pastos naturales, sin el agregado de insumos balanceados, ni suplementación de minerales y vitaminas, lo cual constituye una clara ventaja sobre otras especies de animales que viven bajo las mismas condiciones (Garnica y Bravo, 2001).





Figura 1. Alpacas pastoreando en la localidad de Macussani-Puno. Año 2007.  
(CONOPA)

Con una población de 3'592.249 cabezas, el Perú es el principal país productor de alpaca en el mundo siendo las regiones Puno y Cuzco las de mayores poblaciones (INEI, 2012). Domesticada desde la vicuña silvestre en la sierra central andina hace seis o siete mil años atrás (Wheeler, 1995), la alpaca es un recurso importante en toda la región alto andina por lo cual la crianza de los camélidos sudamericanos (CSA) en el Perú es una de las actividades pecuarias más importantes en la población económicamente activa de la sierra. El 90% se encuentra en manos de comunidades campesinas y pequeños productores de las regiones altoandinas del Perú (FAO, 2005).

Un factor limitante en el aprovechamiento y productividad de las alpacas es la aparición de enfermedades infecciosas causantes de la más alta mortalidad y morbilidad en crías y adultos. (Ameghino y De Martini, 1991; Moro, 1987; Ramírez, 1991). Un estudio de seis años (1982-88) mostró, de 41,569 recién nacidos muertos (crías) de rebaños comunales en el departamento de Puno, la mayor zona productora de alpaca en el Perú, determinó que los trastornos

entéricos, especialmente enterotoxemia fue responsable del 44% de la mortalidad (Ameghino y De Martini, 1991).

Las alpacas y llamas, al igual que otras especies domésticas, presentan las mayores tasas de morbilidad y mortalidad en los primeros meses de vida. En un estudio realizado en Estados Unidos se determinó una mortalidad del 2,1% en llamas y alpacas en el periodo pre destete (Sharpe *et al.*, 2009). En el Reino Unido en un estudio epidemiológico realizado en 689 camélidos de edades comprendidas entre menos de seis meses y los diez años de vida se determinaron mortalidades entre el 2,7 y 3,3% en llamas y entre el 3,5 y el 6,9 % en alpacas. No obstante, entre el 17 y 33% de las muertes de alpacas correspondieron a animales menores de seis meses (Davis *et al.*, 1998; Wright *et al.*, 1998). En otro estudio, también en el Reino Unido, se indica a los problemas sanitarios en las explotaciones de camélidos como una de las causas más importantes de mortalidad neonatal y periparto (D'Alterio *et al.*, 2006).

En Sudamérica, en las condiciones de explotación del altiplano, las tasas de mortalidad son mucho más elevadas. En un centro de investigación de camélidos en Perú, la mortalidad en el periodo pre-destete durante un tiempo de tres años fue del 12%, en algunos casos pueden superar el 50% de los animales nacidos o puede alcanzar hasta el 70%. (Ramírez, 1987; Bustinza *et al.*, 1988; FAO, 2005).

Las principales causas de mortalidad neonatal en estas especies son las enfermedades infecciosas y el manejo inadecuado, puesto que las enfermedades más frecuentes en los neonatos se asocian a fallos en la transferencia de la inmunidad materna (Ameghino y De Martini, 1991).

## **2. PLACENTACION EN LA ALPACA**

La morfología de la placenta en alpacas fue ampliamente estudiada por ser de importancia en el aspecto reproductivo, Steven *et al.* (1980) y Fowler y Olander (1990), demostraron la naturaleza epiteliocorial y difusa de la placenta

de alpacas y llamas, respectivamente, enfatizando además la morfología similar en algunos aspectos con el cerdo, yegua y camélidos del viejo mundo (Olivera *et al.*, 2003).

Mediante microscopía electrónica de barrido, se pudo comprobar que, a lo largo de toda la gestación, la placenta de alpaca presenta depresiones y concavidades en la superficie del útero, considerando que en el trofoblasto la superficie era irregular debido a la presencia de numerosas proyecciones; ambos casi perfectamente entrelazados uno con el otro (Olivera *et al.*, 2003).

Ultraestructuralmente, el trofoblasto y las microvellosidades epiteliales uterinas comparten una mutua y casi perfecta interdigitación (Olivera *et al.*, 2003). A ambos lados de la interfase materno-fetal, la región apical del trofoblasto y epitelio uterino contenía numerosas vesículas recubiertas y sin recubrir, así como una actividad de fosfatasa alcalina en las superficies celulares (Olivera *et al.*, 2003). Dilataciones o vesículas pueden ser observadas a veces en las bases de las microvellosidades del trofoblasto, contiguas al espacio extracelular y que a menudo contienen electrones de alta densidad (Olivera *et al.*, 2003).

Se han descrito los cambios en el desarrollo experimentado por la interfase materno-fetal durante la implantación en estos animales. Los procesos de aposición y adhesión de implantación fueron seguidos hasta el día 45 de la gestación, durante el cual el perímetro de la interfase materno-fetal y el corion vascularizado demostraron estar estrechamente asociados (Olivera *et al.*, 2003).

En alpacas fue observado que la superficie uterina no presenta las típicas áreas carunculares similares a lo descrito en las vaca, oveja y cabra. La distancia entre las microvellosidades fetales y la superficie materna aparecen mucho más cortas que otras especies de ungulados, esto se supone debido a la adaptación a grandes alturas. Por este tipo de placenta, las retenciones de placenta en alpacas son muy raras ya que típicamente tiene capilares maternos

y fetales que invaden el epitelio y el trofoblasto, esto ocurre a lo largo de la interfase materno fetal, este tipo de placenta es ligeramente similar en yeguas y cerdas. Las membranas fetales de los camélidos, sin embargo, muestran características particulares, son muy largas células que contienen un núcleo largo y con numerosos nucléolos en el trofoblasto, esto también fue encontrado en bactrianos y dromedarios. Otra característica que comparte con las placentas epiteliocoriales es la presencia de aureolas en la superficie del corion, como se encuentra en la cerda, yegua, pecaríes y camélidos (Olivera *et al.*, 2003).

La placentación epiteliocorial de los camélidos impide el pasaje de las inmunoglobulinas al feto como sucede en los demás rumiantes (Weaver *et al.*, 2000a). Consecuentemente, los neonatos nacen hipogammaglobulinémicos y toda la inmunidad perinatal depende de una adecuada absorción del calostro y las inmunoglobulinas de la leche (De Genst *et al.*, 2006). Además, algunos estudios han determinado que las principales inmunoglobulinas en el calostro de los camélidos son las IgG (Weaver *et al.*, 2000b), y que sus concentraciones en el calostro son más altas en los bovinos y caballos (3400-3900 mg/dl y 1500-5000 mg/dl respectivamente) (Keamber *et al.*, 2001).

### **3. ASPECTOS INMUNOLOGICOS**

#### **3.1 Desarrollo fetal del Sistema Inmunitario.**

El desarrollo del Sistema Inmune de los mamíferos sigue un patrón constante, siendo el timo, el primer órgano linfoide que se desarrolla, seguido de cerca por los órganos linfoides secundarios (Tizard, 2009). El esbozo del timo en fetos de alpacas es visible a partir de los 40 días de edad pudiéndose observar Timocitos a los 40 días de gestación, infiriéndose que éstas células son pro timocitos o linfoblastos que están siendo reclutadas desde órganos hematopoyéticos fetales hacia el timo primitivo para poblarlo, e iniciar el proceso de maduración tímica el cual originará a los primeros linfocitos T (Montenegro *et al.*, 2006).

En el timo fetal de alpaca se aprecian grupos celulares hematopoyéticos indiferenciados, formando nidos compatibles con células eritroblásticas. Estas células se ubican en las cavidades del timo inmaduro de 60 días, pero a partir de que el timo se organiza, sus cavidades se pueblan de timocitos, definiéndose la corteza y médula. Las células se ubican principalmente en las áreas trabeculares, subcapsulares, y ocasionalmente en la corteza periférica (Montenegro *et al.*, 2006).

Los linfocitos B aparecen después del desarrollo del bazo y de los nódulos linfáticos, pero los anticuerpos no se sintetizan hasta el final de la etapa fetal, en muchos casos (Tizard, 2009).

En alpacas al día 55 de gestación ya se encuentra presente estructuralmente el bazo, encapsulado y con parénquima con tejido conectivo embrionario con nidos hematopoyéticos y entramado reticular, lo cual es indicativo que el tejido está diferenciándose y especializándose en tejido conjuntivo. La diferenciación de la pulpa blanca y roja del parénquima esplénico se observó en fetos de 120 días. A partir de esa edad se observa una mayor consolidación de la citoarquitectura y también los cúmulos linfoides están mejor organizados, pues se les aprecia como una malla compuesta de células y fibras reticulares que atrapan linfocitos, alrededor de una arteriola central; pudiéndoseles denominar como folículo linfoide inmaduro (Arias *et al.*, 2011).

La capacidad del feto para responder a los antígenos se desarrolla muy rápidamente tras la formación de los órganos linfoides, pero no todos los antígenos son igualmente capaces de estimular el tejido linfoide fetal. El sistema inmune se desarrolla en una serie de etapas y en cada una se capacita al feto para responder a más antígenos. Estas etapas dependen del incremento gradual en el uso de la conversión génica o mutación somática para incrementar la diversidad de anticuerpos (Tizard, 2009).

### **3.2 Respuesta Inmune de los Animales Recién Nacidos.**

El sistema inmune adquirido es completamente virgen en el momento del nacimiento y, en consecuencia, es muy lento en responder a los agentes invasores. El suero de animales recién nacidos también carece de algunos componentes del complemento, lo que da como resultado una actividad opsonizante débil que refleja en una mayor susceptibilidad a la infección. Por lo tanto, las respuestas inmunes innatas son críticas para la supervivencia durante las primeras semanas de vida. Los recién nacidos producen una variedad de moléculas antimicrobianas, incluyendo componentes del complemento en bajas concentraciones, lectinas tales como pentraxinas y colectinas, y péptidos como defensinas, lactoferrina, y lisozima. En el caso del pulmón de cordero fetal preparto se producen las proteínas surfactantes A y D, así como la  $\beta$ -defensina 1 y el receptor de tipo TLR4. Como resultado, los agentes patógenos se opsonizan y se eliminan con relativa eficacia y los TLR están presentes y funcionales en el recién nacido. Cerca del nacimiento, la capacidad fagocítica y bactericida de los neutrófilos disminuye como resultado del incremento de los niveles de esteroides. Por ejemplo, Los neutrófilos de los potros recién nacidos se desplazan relativamente lentos, comparados con los de sus madres. No obstante, la actividad fagocítica y bactericida en el potro fetal no difiere de la de las células de la yegua. Tras el nacimiento, los macrófagos muestran respuestas quimiotácticas deprimidas y a diferencia de los adultos, también son capaces de tolerar el crecimiento de algunos virus. La actividad antiviral se adquiere gradualmente (Tizard, 2009).

Los neutrófilos de los potros recién nacidos se desplazan relativamente lentos, comparados con los de sus madres. No obstante, la actividad fagocítica y bactericida en el potro fetal no difiere de la de las células de la yegua (Tizard, 2009).

Tras desarrollarse en el ambiente estéril del útero, los mamíferos nacen en un ambiente rico en microorganismos, siendo capaces de desarrollar respuestas inmunes, tanto innatas como adquiridas, en el momento del

nacimiento. Sin embargo, cualquier respuesta inmune adquirida desarrollada por un recién nacido debe ser de tipo primario, con un periodo de latencia prolongado y baja concentración de anticuerpos. Los animales recién nacidos también desarrollan respuestas inmunes del tipo Th2 mas que Th1, los linfocitos Th1 del recién nacido parecen ser muy sensibles a la apoptosis inducida por la Interleuquina-4 (IL-4) e IL-3. Algunas citoquinas Th1, como el IFN- $\gamma$ , parecen dañar la placenta. Por tanto, esta preferencia por las respuestas Th2 no es accidental y posiblemente sea debido a la influencia hormonal durante la gestación. Las respuestas inmunes generalmente revierten al equilibrado patrón del adulto durante los primeros meses de vida (Tizard, 2009).

En alpacas la expresión de citoquinas (tanto Th1 y Th2) se puede detectar a partir del primer día de edad aún en animales neonatos que no han consumido calostro, se expresan desde el nacimiento y en forma ascendente y gradual hasta la quinta semana de nacimiento. Se sabe que los animales enfermos expresan una mayor cantidad relativa de citoquinas, tanto a las respuestas Th1 como Th2, en relación a los animales recién nacidos que no han consumido calostro y los animales sanos (Chiok, 2012).

El desarrollo adecuado del sistema inmune del recién nacido depende en gran medida de la exposición a la microbiota intestinal. Se ha observado que en algunas especies de animales “libres de gérmenes” suelen ser incapaces de desarrollar tejidos linfoides asociados al intestino (GALT). Se menciona que la microbiota comensal produce una mezcla de patrones moleculares asociados a patógenos o polisacáridos, y algunos de los cuales son captados por las células dendríticas para presentarlos a los linfocitos T CD4+ y activarlos en forma policlonal. Además, paralelamente otras células reciben una diversidad de señales a través de los TLR necesarias para promover colectivamente el desarrollo funcional completo del sistema inmune. En esta etapa crítica, sin embargo, a no ser que se reciba ayuda inmunológica adicional, algunos microorganismos que

presentan una débil amenaza para los adultos, pueden ser letales para los recién nacidos. Esta ayuda inmunológica es aportada por los anticuerpos transferidos por la madre a su descendencia a través del calostro (Tizard, 2009).

### **3.3 Transferencia de Inmunidad de la Madre a la Descendencia.**

La vía por la que los anticuerpos maternos llegan al feto viene determinada por la estructura de la placenta. En los seres humanos y en otros primates la placenta es hemocorial, permitiendo que la sangre materna entre en contacto directo con el trofoblasto. Este tipo de placenta permite fácilmente la transferencia de las IgG maternas hacia el feto, no así las IgM, IgA o IgE. Las IgG maternas, por lo tanto, penetran a la circulación fetal y el recién nacido humano tiene niveles comparables a los de su madre (Tizard, 2009).

En las especies de ganado, la presencia de IgG indica la capacidad de hacer frente a los agentes infecciosos que pueden provocar el desarrollo de anticuerpos. El método de la transferencia de IgG de la madre a los recién nacidos depende de la especie. El calostro es la fuente de IgG en especies de ganado, incluidos los caballos (Jeffcot, 1974), vacas (Penhale y Christie, 1969) y ovejas (Hunter *et al.*, 1977).

A pesar de que la respuesta inmune activa puede desarrollarse en los rumiantes recién nacidos, su eficacia es limitada a causa de la variabilidad del inicio en la respuesta inmune a diferentes patógenos (Garmendia *et al.*, 1986). Durante las primeras semanas después del nacimiento, la protección contra las enfermedades infecciosas en terneros, corderos, potros, cerdos y rumiantes salvajes depende exclusivamente de la inmunoglobulina transferida a través del calostro (Garmendia *et al.*, 1986).

En rumiantes la placenta es sindesmocorial, es decir, el epitelio coriónico está en contacto directo con los tejidos uterinos, mientras que la placenta de caballos y cerdos es epiteliocorial, estando el epitelio coriónico en



contacto con el epitelio uterino intacto (Tizard, 2009). La alpaca al presentar una placenta de tipo epiteliocorial difusa impide la transferencia pasiva de inmunoglobulinas de la madre al feto durante la gestación, razón por la cual las crías de alpacas nacen prácticamente agammaglobulinémicas y su inmunidad inicial depende exclusivamente de las inmunoglobulinas presentes en el calostro, el cual debe ser consumido y absorbido en cantidades adecuadas durante las primeras 12 horas después del nacimiento (Ameghino y De Martini, 1991; Wernery, 2001). Consecuentemente, las madres tienen que proveer de inmunoglobulinas mediante el calostro, a sus crías y las fallas que puedan observarse en esta transferencia ocasionaría una elevada mortalidad de neonatos (Quispe, 2009).

### **3.4 Secreción y composición del Calostro.**

El calostro es una secreción de la glándula mamaria acumulada durante las últimas semanas de gestación, contiene proteínas transferidas activamente desde la circulación sanguínea bajo la influencia hormonal: estrógenos y progesterona. El calostro está compuesto mayoritariamente de agua, lípidos, grasas, azúcares, y diversas proteínas (caseína e inmunoglobulinas) Contiene por lo menos tres formas diferentes de inmunoglobulina con predominancia de IgG (65-90%) y componentes minoritarios de IgA (Smith, 1990; Tizard, 2009).

En el calostro de los caballos y cerdos, la IgG prevalece en el calostro, pero sus concentraciones se reducen rápidamente a medida que transcurre la lactación y a la transformación en secreción láctea en la que predomina la IgA. En rumiantes, la IgG es la clase de inmunoglobulina preponderante tanto en leche como calostro (Tizard, 2009).

En los CSA, los largos períodos de lactancia del recién nacido de hasta ocho meses, los hacen altamente dependientes de la producción de leche materna durante este período (FIA, 2000). En llamas, hay informes más completos y se supone que, en general, en términos de los componentes

principales, el calostro es similar en las especies silvestres (vicuña y guanaco) de los camélidos sudamericanos (Fowler, 1989; Ameghino y Martini, 1991; Morín *et al.*, 1995).

Algunos estudios han determinado que las principales inmunoglobulinas en el calostro de los camélidos son las IgG (Weaver *et al.*, 2000a), y que sus concentraciones en el calostro son más altas en los bovinos y caballos (Kamber *et al.*, 2001).

El calostro de la alpaca es altamente rico en cantidad de isotipos de IgG en comparación con la leche transicional. Un ejemplo es que los anticuerpos de cadena pesada representaron el 38,5% del total del IgG del calostro. En alpacas, los isotipos predominantes en el calostro fueron IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub>, siendo igualmente representados, y después la IgG<sub>2</sub>. Dentro de las 24h post parto, las concentraciones de IgG en la leche transicional decaen aproximadamente 10 veces según los estudios. La presencia de los anticuerpos de cadena pesada en secreciones lácteas es consistente con el papel de los anticuerpos de cadena pesada en la transferencia pasiva de la inmunidad de los neonatos. Los análisis de isotipos individuales de IgG indican que los isotipos convencionales y los isotipos de cadena pesada son representadas en el suero, calostro y leche en similares concentraciones relativas, demostrando que la transferencia no es selectiva (Daley-Bauer *et al.*, 2010).

### **3.5 Inmunoglobulina G**

La inmunoglobulina G (IgG) es una glicoproteína encontrada en todas las especies en concentraciones que pueden oscilar entre 900 mg/dL a 2400 mg/dL. Esta IgG representa aproximadamente el 20% de la proteína total encontrada en el plasma o suero sanguíneo. La IgG tiene una vida promedio de 23 días. Esta contribuye en la inmunidad contra bacterias, virus, parásitos y algunos hongos. La IgG es capaz de activar el sistema del complemento (Jorgensen, 1991).

La IgG es la inmunoglobulina que alcanza mayor concentración en la sangre y por esta razón juega un papel primordial en los mecanismos de defensa mediados por anticuerpos. Con un peso molecular alrededor de los 180kDa y una estructura típica con dos cadenas ligeras idénticas ( $\kappa$  o  $\lambda$ ) y dos cadenas pesadas y también idénticas. Debido a que es la más pequeña molécula de inmunoglobulina, la IgG puede extravasarse de los vasos sanguíneos con mayor facilidad que las demás inmunoglobulinas. Esto es especialmente importante en la inflamación, donde el incremento de la permeabilidad vascular permite a la IgG participar en la defensa en los tejidos y superficies corporales. (Tizard, 2009).

En los camélidos existe una inmunoglobulina G constituida solamente por cadenas H, desprovista de cadenas ligeras, lo cual aparentemente es un hecho único entre los mamíferos (Hammers-Casterman *et al.*, 1993).

En los camélidos, se conoce que más del 75% del total de IgG son moléculas de IgG carentes de cadena ligera y referidas como IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>3</sub>, y característicamente mucho más pequeñas (90 kDa) que los anticuerpos convencionales (150 kDa), con capacidades de mejor penetración tisular y una mejor biodistribución (Wernery, 2001). Los atributos biofísicos de los anticuerpos de cadena pesada en alpacas son comparables a aquellos anticuerpos convencionales, con algunas excepciones importantes. La ausencia de los dominios CH1 da al anticuerpo de cadena pesada aparente menor peso molecular que las cadenas y convencionales. Esta diferencia, junto con la ausencia de cadenas ligeras hace de los anticuerpos de cadena pesada considerablemente más pequeños que los anticuerpos convencionales, lo cual les permite un mayor acceso a los antígenos (Ags) (Daley-Bauer *et al.*, 2010). Estos anticuerpos, denominados microglobulinas, serían mucho más eficientes, por ejemplo, para neutralizar enzimas, que los anticuerpos convencionales. Se desconoce, los efectos biológicos de estas microglobulinas en la transferencia pasiva, aunque aparentemente ya se sabe que isotipos de IgG se encuentran presentes en

calostro y, sobre todo, que estas microglobulinas se encuentran presentes en las secreciones calostrales (Flodr *et al.*, 2012; Daley-Bauer *et al.*, 2010).

Después de la ingestión del calostro, las concentraciones relativas de cada isotipo en el suero de la cría son similares a las del suero de la madre, demostrando que la absorción por la cría no es selectiva. Las IgG del suero en crías de alpaca decrecen durante las primeras 4 a 6 semanas de vida, muy similares con los dromedarios. En un estudio, se encontró que los anticuerpos monoclonales de cadena pesada disminuyen rápidamente en comparación con las IgG convencionales en el suero de las crías (50% en 14 días y 20 a 25 días, respectivamente), sugiriendo que los anticuerpos monoclonales de cadena pesada puedan haber tenido un menor tiempo de vida media que pueda influenciar en su función (Daley-Bauer *et al.*, 2010).

### **3.6 Absorción Del Calostro.**

Los neonatos que maman poco después del nacimiento ingieren calostro. Por ejemplo, los terneros que maman de forma natural, la actividad proteasa del tracto digestivo es baja y se reduce aún más por los inhibidores de la tripsina presentes en el calostro. Por tanto, las proteínas calostrales no se degradan para utilizarse como fuente de alimento, y alcanzan intactas el intestino delgado (Tizard, 2009).

Se ha comprobado que la transmisión de inmunoglobulinas de la madre a la cría en alpaca se lleva a cabo fundamentalmente a través de la absorción del calostro neonatal (Garmendia y McGuire, 1986). Por un lado, se sabe que las inmunoglobulinas del calostro se unen a receptores Fc especializados en las células del intestino neonatal (FcRn). Estos receptores parecen cumplir un rol clave en la mayoría de los procesos de transmisión de los mamíferos. A pesar de su nombre, el FcRn se expresa en todas las edades y en muchos tejidos, aunque a diferentes niveles de expresión, y probablemente estén implicados en la secreción activa de IgG hacia el calostro (Baintner, 2007; Tizard, 2009).

El FcRn, en términos generales, es requerido para la transmisión del anticuerpo a través de los tejidos. Sin embargo, en la glándula mamaria de los rumiantes una señal (probablemente hormonal) puede desencadenar el proceso de transmisión en presencia de FcRn. En las células alveolares y del ducto de la ubre ovina y bovina el receptor puede cambiar su localización intracelular durante la formación de calostro, es decir, durante las últimas 2 semanas de embarazo (Baintner, 2007).

Por otro lado, los receptores de Fc neonatal se dividen en ácido dependientes y ácido independientes. En un ambiente ligeramente ácido (pH entre 5 a 7) ambos tipos pueden unirse al IgG, pero los receptores ácido dependientes no funcionan a un pH ligeramente alcalino. Un ambiente ácido se encuentra en el intestino delgado proximal de mamíferos lactantes, como también en vesículas y endosomas de diferentes tipos celulares (Baintner, 2007). Durante el período de lactación, la secreción de ácido clorhídrico (HCl) y pepsinógeno decrece, esto posibilita a que la IgG materna pueda pasar sin degradarse hacia el intestino delgado. El FcRn se encuentra a nivel del ribete en cepillo del enterocito, es ahí donde la IgG calostrual a pH ácido se une al receptor, protegiéndolo de las proteasas intestinales. Una vez formado el complejo FcRn-IgG, las moléculas de inmunoglobulinas entran por endocitosis en las células epiteliales intestinales. Después de la internalización del complejo, pasan a los vasos quilíferos y posiblemente a los capilares intestinales. Finalmente, las inmunoglobulinas absorbidas alcanzan la circulación sanguínea, recibiendo así los animales recién nacidos una transmisión masiva de inmunoglobulinas maternas, aunque el mecanismo de transmisión aún no está del todo claro (Baintner, 2007, Tizard, 2009).

Los animales recién nacidos se diferencian por la selectividad y duración de la permeabilidad intestinal. En caballos predomina la Absorción de IgG e IgM, en rumiantes no es selectivo pasando toda clase de inmunoglobulinas (Tizard, 2009). Aunque la IgG<sub>1</sub> bovina se une a FcRn y se secreta de manera eficiente, mientras que IgG<sub>2</sub> muestra poca afinidad. La secreción

diferencial asegura la provisión de inmunoglobulina al becerro recién nacido y protege a la vaca del agotamiento excesivo de anticuerpo. (Baintner, 2007).

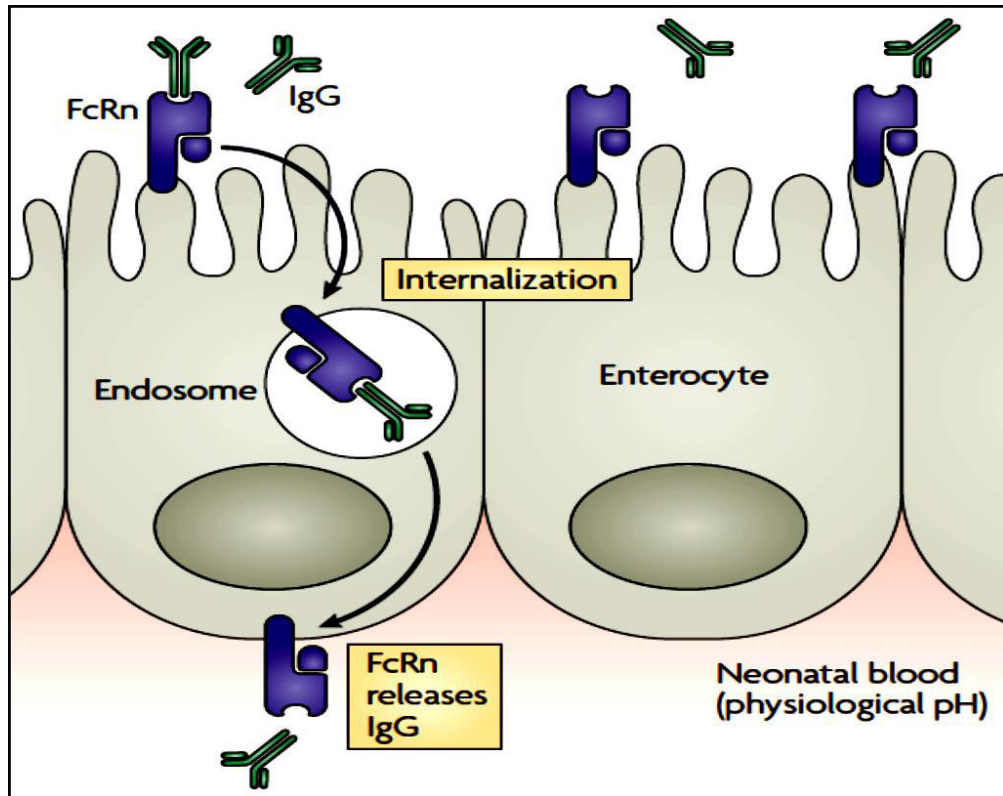


Figura 2. Proceso de Absorción de Inmunoglobulinas a nivel intestinal. La IgG llega al lumen intestinal el cual es captado por el receptor FcRn facilitado también por el Ph ácido del ambiente, pasa por endocitosis a través del enterocito hasta el torrente sanguíneo, el cual, debido al Ph ligeramente alcalino de la sangre se disocia y la molécula de IgG queda libre y circulando. (Roopenian y Akilesh, 2007).

La duración de la permeabilidad intestinal varía entre las especies y entre las clases de inmunoglobulinas, en la alpaca en particular, el proceso absorptivo es hasta las 48 horas post nacimiento, momento donde se cierra el proceso de absorción. Por lo general, en la mayoría de especies, la permeabilidad es más elevada justo después del nacimiento y desciende alrededor de seis horas, posiblemente porque las células epiteliales intestinales poseedoras de FcRn son sustituidas por otras más maduras que no expresan ese receptor. Como regla general, la absorción de todas las clases de inmunoglobulinas disminuye a niveles muy bajos 24 horas

después del nacimiento. La alimentación con calostro tiende a acelerar este cierre, mientras que el retraso en la ingestión de alimento ocasiona un ligero retraso del cierre de absorción (hasta 33 horas o más) (Garnica y Bravo, 2001; Tizard, 2009).

En la primera 24-36 h de vida, el epitelio del intestino delgado de los rumiantes se compone de los enterocitos fetales que son capaces de internalizar macromoléculas del calostro. Un sistema poco conocido, pero eficiente, que se produce en el saco vitelino y el intestino de animales recién nacidos, se describe como un proceso que comienza con la captación no selectivo de las proteínas (y/u otras macromoléculas) por un orgánulo membranoso, el sistema canalicular apical (ACS, también conocido como complejo apical endocítico), es un complejo de los túbulos citoplasmáticos cerca de la membrana apical de los enterocitos, es responsable de la formación de vacuolas en el citoplasma que servirán para la absorción de proteínas intactas, tales como inmunoglobulinas, desde el lumen intestinal. El material absorbido se libera por la membrana basolateral de la célula y a partir de entonces es transportado por el sistema linfático, alcanzando el torrente sanguíneo (Baintner, 2007; Moretti *et al.* 2012).

El cierre intestinal se produce cuando los enterocitos ya no son capaces de transferir inmunoglobulinas para el sistema circulatorio del recién nacido y representa el final de la transferencia de inmunidad pasiva. Este proceso se produce de dos a tres días después del nacimiento y coincide con la renovación de la totalidad del epitelio intestinal, las nuevas células, los enterocitos de tipo adulto, no tienen las mismas características ultraestructurales de las de tipo fetal y, por lo tanto, son incapaces de internalizar macromoléculas. (Moretti *et al.* 2012).

El cierre está relacionado con la maduración de las células epiteliales y el comienzo de la digestión y absorción de nutrientes por el tracto intestinal, también la prevención de la internalización de sustancias extrañas al

cuerpo del recién nacido, incluyendo las toxinas bacterianas y los virus (Moretti *et al.* 2012).

Existe una variación intraespecífica significativa en las concentraciones de IgG del calostro, los picos de las concentraciones de inmunoglobulinas séricas después de la ingestión de calostro, el intervalo de tiempo necesario para alcanzar el pico, y la vida media de la inmunoglobulina en el suero neonatal (Weaver *et al.*, 2000a).

En alpacas las concentraciones de IgG en la secreción mamaria de animales preñados son elevadas antes del parto, y es casi diez veces superior al del suero. Esto afirma que hay una gran acumulación y producción de IgG en la glándula mamaria de las alpacas preñadas (Bravo *et al.*, 1997).

La inmunoglobulina principal que se encuentra en el suero de las crías de alpaca fue la IgG (Garmendia y McGuire, 1986). Además, la deficiente transferencia pasiva de IgG del calostro se ha asociado con la mortalidad de las crías (Garmendia *et al.*, 1986).

En el año 2001 un estudio evaluó la absorción de IgG desde el momento del nacimiento hasta el 5 día. Los resultados indicaron que la absorción de IgG en alpacas empieza a las seis horas después de la ingestión del calostro, donde la mayor absorción se alcanza a las 24 horas después de la ingestión de calostro (Garnica y Bravo, 2001). El cierre del proceso absorptivo en alpacas ocurre a partir del segundo día (48 horas) para adelante hasta aproximadamente cinco días (Garnica y Bravo, 2001).

En un estudio realizado en el año 2008, los resultados mostraron que las crías de alpaca ya tienen concentraciones de IgG al momento del nacimiento, aunque estas no resulten significativas (397,284 mg/dl) para una adecuada protección contra agentes externos, calculándose además



que la edad a la que se alcanza concentraciones adecuadas de IgG ( $\geq 1000$  mg/dl) en suero es aproximadamente a partir de los 79 días (Quispe, 2009).

### **3.7 Falla de Transferencia Pasiva.**

La absorción del IgG calostroal es necesaria para la protección del recién nacido frente a enfermedades septicémicas (Tizard, 2009). Por lo cual la Falla de Transferencia Pasiva (FTP) de inmunoglobulinas maternas es el déficit más importante en la medicina veterinaria, ya que se correlaciona significativamente a las numerosas infecciones en la vida posnatal. La transferencia de anticuerpos maternos a partir de suero de calostro para el tracto intestinal y finalmente al sistema vascular neonatal es un proceso complejo con muchos sitios de interrupción (Wernery, 2001).

La transferencia de las inmunoglobulinas de la madre para el recién nacido es un factor crítico que determina la supervivencia del recién nacido. La FTP no es una enfermedad, sino más bien una condición fisiológica que predispone a los recién nacidos al desarrollo de la enfermedad. La FTP se ha relacionado con aumento de la morbilidad y la mortalidad en terneros, corderos, potros, terneros y alpacas. Diversos estudios demostraron tasas de FTP de hasta un 35% en el ganado vacuno y 19 a 24% en potros (Weaver *et al.*, 2000a).

La importancia de la transferencia pasiva de inmunoglobulinas de calostro en terneros recién nacidos, corderos, y potros, y la demostración de un mecanismo similar de transferencia de inmunidad pasiva en crías de alpacas hacen a la FTP una explicación probable para la alta mortalidad en crías en nuestro país (Garmendia *et al.*, 1986).

En un estudio realizado en el 2001, se muestra los resultados del proceso absorbivo de inmunoglobulina G en alpacas crías, a través del estudio de las concentraciones de IgG en la secreción láctea de 20 alpacas madres y el estudio de las concentraciones de IgG en el suero sanguíneo de sus crías, permitió diferenciar un 85% (34 crías) que presentaron perfil

absortivo superior y homogéneo , diferente al 15% (6 crías) restantes, donde se puede observar que los coeficientes de absorción son inferiores deduciendo que podría deberse a fallas en la transferencia pasiva de IgG en dichas crías (Garnica y Bravo, 2001).

Estudios en potros demostraron que entre 2,5 a 17% de los recién nacidos sufren de FTP. Las razones varían, por ejemplo, en un animal que no amamanta durante el lapso de las primeras 16 horas o madres que no tienen un nivel adecuado de calostro como para brindar una buena protección al potro (Jorgensen, 1991).

En 1988, otro estudio realizó una encuesta a la Sociedad Internacional de Perinatología en Medicina Veterinaria, donde de 287 potros de siete días de edad o menores que ingresaron a cuidados intensivos; 21% tenían infecciones generalizadas, 17% tenía infecciones localizadas y 33% tenían enfermedades gastrointestinales, tales como diarrea, sepsis o infección por *E. Coli*. Los datos globales sugieren que una adecuada transferencia pasiva está asociada con la ausencia o disminución de casos de enfermedades infecciosas, además de la supervivencia (Jorgensen, 1991).

En otro estudio se muestra las tasas de infección del 6% de potros con niveles de IgG inferior a los 800 mg/dl y 3% en potros mayores de 800 mg/dl. Un estudio posterior realizado recogió datos de 132 potros, los cuales sugieren que los niveles de IgG séricos no se relacionaban con la aparición o la gravedad de la enfermedad en potros. Algunas especulaciones manifiestan que estos estudios se realizaron en granjas con un adecuado manejo, cerca de hospitales o de controles sanitarios para potros recién nacidos donde podría mantenerse la exposición a posibles infecciones. En un estudio aparte, mencionan que mediante el cambio de las prácticas de manejo la incidencia de falla de transferencia pasiva podría reducirse del 19% al 11% en los 2 primeros años de implementarse dichas prácticas. De los estudios antes mencionados, se puede llegar a dos conclusiones; primero, los niveles de IgG séricos

necesarios que deben estar presentes en un recién nacido para proteger al animal de una infección depende de los agentes infecciosos presentes en el área de parto y; en segundo lugar, la ingesta del calostro es dependiente del manejo en el recién nacido, lo cual garantiza una adecuada ingesta de calostro (Jorgensen, 1991).

En 1999, para determinar el estado de la transferencia pasiva, se realizó un estudio sobre la dinámica de la concentración de la IgG en suero de alpacas y llamas neonatas, donde de acuerdo al estudio en ciertos animales se obtuvo concentraciones de IgG menores o iguales a 1.000 mg/dl a las 48 horas de vida, valores que se establecieron y consideraron para definir FTP en llamas y alpacas. Las concentraciones séricas de IgG no fueron significativamente diferentes entre las llamas y alpacas en ninguno de los tiempos de muestra. En consecuencia, las recomendaciones que se hacen para las llamas sobre la transferencia pasiva de IgG podrían, extrapolables a alpacas (Weaver *et al.*, 2000a).

En 1986 Garmendia *et al.*, en un estudio con 82 animales estableció la FTP a las 48 horas de nacido a los animales con concentraciones menores o iguales a 900 mg/dl, donde animales a los 2 días de edad con concentraciones menores a la indicada mostraba una tasa de mortalidad del 90%. Otro dato de importancia es que se observó que la mortalidad comenzaba a reducirse drásticamente conforme aumentaba la concentración de IgG séricas, llegando a ser nula en individuos con concentraciones de 2900 mg/dl de IgG, por lo cual considero a individuos debajo de ese valor como casos de FTP parcial (Garmendia *et al.*, 1986). En un estudio en camélidos, las crías con concentraciones séricas de IgG de 1.000 mg/dl a más tienen un menor riesgo de mortalidad, comparado con aquellos que tienen concentraciones de IgG menores a 1.000 mg/dl (Wernery y Tyler, 2000).

El resultado de un estudio en alpacas en el Perú indicó que la tasa de FTP fue del 9%. La mortalidad global fue del 12%, mientras que en crías con FTP, la mortalidad fue del 78%. La mortalidad fue significativamente mayor en crías con FTP que en crías con concentraciones de inmunoglobulinas adecuadas (Garmendia *et al.*, 1986.). En un estudio realizado en los Estados Unidos, la tasa de FTP en un grupo de 39 crías (29 llamas, 10 alpacas) fue del 20,5%. Sin embargo, las crías recién nacidas no murieron ni tampoco presentaron signos de enfermedad sistémica. Estos resultados indican que es posible que las crías con FTP puedan sobrevivir, especialmente en condiciones de baja presión infecciosa microbiana (Weaver, 1999; Weaver *et al*, 2000b).

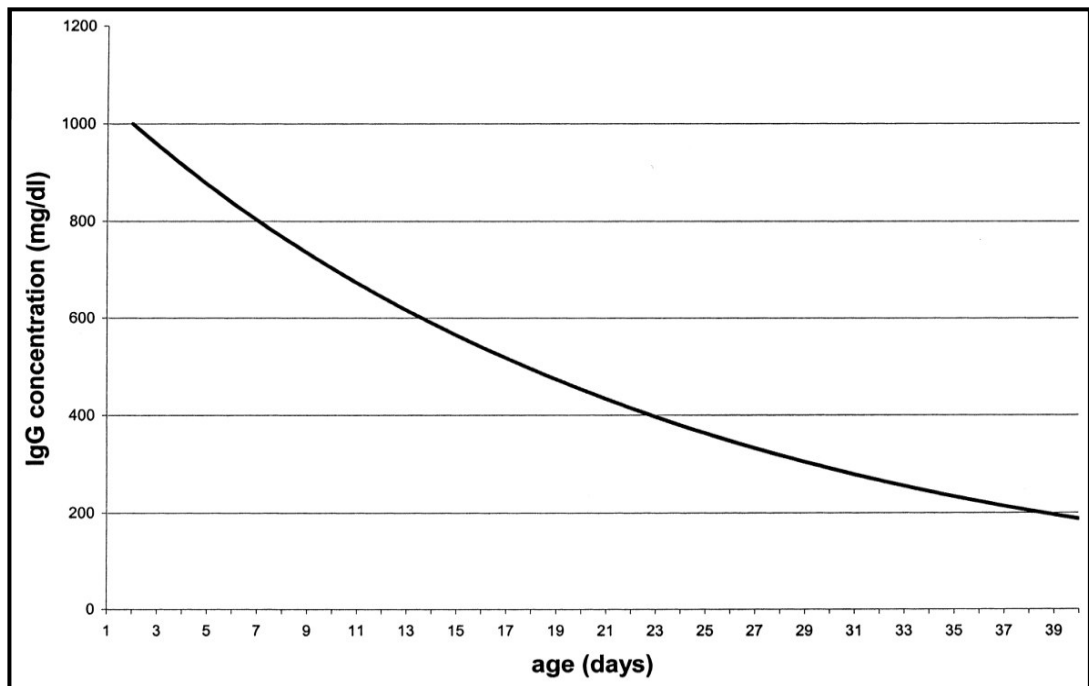


Figura 3. Curva teórica de la caída de las concentraciones séricas de IgG en crías de llama y alpaca, basados en una concentración sérica de IgG de 1.000 mg/dl a las 48 horas de vida y una IgG de vida media de 15,7 días (Weaver *et al.*, 2000a).

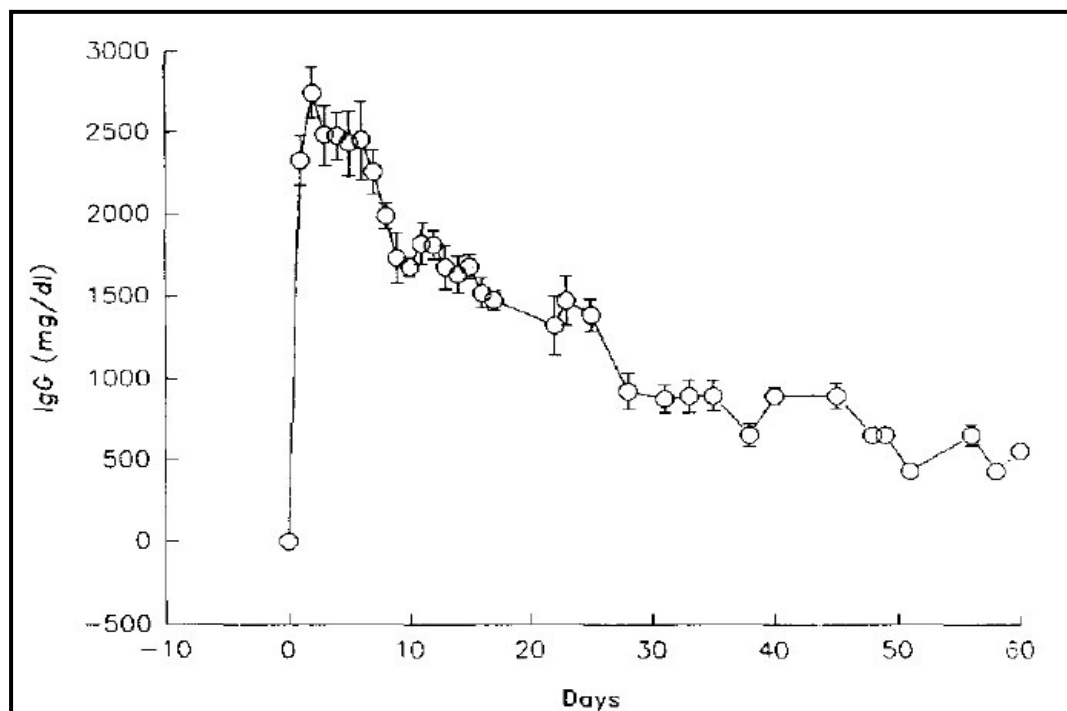


Figura 4. La media de concentración de IgG en crías de 15 llamas y 15 alpacas desde el nacimiento (Tiempo 0) hasta los 60 días de vida (no hay diferencia entre especie y sexo) (Bravo y Garnica, 1997).

Hay varios ensayos comercialmente disponibles para el diagnóstico de FTP en crías. Dos son ensayos de inmunodifusión radial, y el tercero es una prueba de turbidez del sulfito de sodio (SST). Los inmunoensayos no se consideran a menudo porque no se adapta adecuadamente a la configuración de la práctica, ya que son caros y laboriosos de realizar. Además, el tiempo que toma realizar la prueba asociada con los resultados, que, generalmente se obtienen en 24 a 48 horas, a menudo se opone a la intervención oportuna en casos de FTP. En contraste, la prueba SST es económica, fácil de realizar, y proporciona resultados rápidos (Weaver *et al*, 2000b).

Hay tres razones principales por las que la transferencia pasiva a través del calostro puede fracasar; la madre puede producir calostro insuficiente o de mala calidad (Falla en la producción); puede producirse calostro, pero no haber una adecuada ingestión por parte del recién nacido (Falla en la Ingestión); y por último, puede haber un fallo en la absorción intestinal, a

pesar de una ingesta adecuada de calostro (Falla en la absorción) (Tizard, 2009).

### **3.7.1 Falla en la Producción.**

Dado que el calostro representa las secreciones acumuladas de la mama al final de la gestación, los nacimientos prematuros pueden significar que no se ha acumulado suficiente calostro. El calostro de elevado valor puede perderse también como resultado de las lactaciones prematuras o goteo excesivo antes del nacimiento. Los niveles de IgG también varían entre los individuos, como es el caso de las yeguas que en un 28% pueden producir calostro de baja calidad (Tizard, 2009).

### **3.7.2 Falla en la Ingestión.**

En ciertas especies, como en cerdos y ovejas, la ingestión puede ser inadecuada debido a partos múltiples, simplemente porque la cantidad de calostro producido no aumenta en proporción al número de nacidos. Puede deberse también a que la madre carezca de instinto maternal, un problema importante entre las madres jóvenes e inexpertas, o a debilidad del recién nacido, escaso reflejo de succión, o a problemas físicos, tales como mamas dañadas o defectos mandibulares (Tizard, 2009).

### **3.7.3 Falla en la Absorción.**

La falla en la absorción del Calostro a nivel intestinal representa un problema importante en cualquier especie animal. En caballos, por ejemplo, a pesar de las buenas prácticas de manejo, alrededor del 25% de los potros recién nacidos no tienen la capacidad suficiente para captar la adecuada cantidad de inmunoglobulinas calostrales (Tizard, 2009).

De acuerdo a los estudios realizados en el año 2001 por Garnica y Bravo, el 15% de crías presentaron fallas en la difusión pasiva de IgG, a pesar de las altas concentraciones de esta inmunoglobulina en el calostro de las madres (Garnica y Bravo, 2001).

## 4. ENTEROTOXEMIA.

La Enterotoxemia, causada principalmente por el *Clostridium perfringens* tipo A y en menor frecuencia por el tipo C (Moro, 1987) es la infección más devastadora en la población neonatal de alpacas.

### 4.1 Etiología.

En el Perú, la Enterotoxemia de las alpacas o diarrea bacilar o enfermedad de Moro es causada por las toxinas del *Clostridium perfringens* mayormente del Tipo A (Moro, 1971; Moro, 1987; Ramírez, 1989a; Ramírez, 1989b) y, sólo en algunos casos, el tipo C (Moro, 1971; Moro, 1987). En Chile y en E.U.A. han sido reportados los tipos B y D, (Prehn *et al.*, 1999). Inicialmente, esta enfermedad fue considerada como una forma aguda de la denominada fiebre de alpaca, enfermedad causada por el *Streptococcus zooepidermicus*, posteriormente Moro realizó un estudio donde al observar la presencia de un bacilo anaeróbico en heces diarreicas de crías muertas denominándolo diarrea bacilar (Moro, 1971; Ramírez *et al.*, 1985). La confirmación final del agente etiológico de la enterotoxemia, *C. perfringens* tipo A, fue realizado por Moro en el año 1967, tomando como base la detección de la toxina  $\alpha$  (Ramírez *et al.*, 1985).

La clasificación taxonómica del *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) según el Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática (Garrity *et al.*, 2001) es:

Dominio:	<i>Bacteria</i>
Phylum:	<i>Firmicutes</i>
Clase:	<i>Clostridia</i>
Orden:	<i>Clostridiales</i>
Familia:	<i>Clostridiaceae</i>
Género:	<i>Clostridium</i>
Especie:	<i>Clostridium perfringens</i>

Microscópicamente el *C. perfringens* se presenta como un bacilo Gram positivo grueso, recto, solitario o en pares, rara vez en cadena. Las

dimensiones de este microorganismo son de 0.8-1.5  $\mu\text{m}$  de ancho por 4-8  $\mu\text{m}$  de largo (Gillespie y Timoney, 1981). La longitud varía de acuerdo al estado de proliferación, así como la composición iónica y nutricional del medio. Así, los cultivos jóvenes que proliferan con rapidez pueden tener forma casi cocoide o cúbica, mientras en cultivos viejos se observan células más elongadas (Joclik y Willett, 1991).

A diferencia de los otros clostridios patógenos, el *C. perfringens* es inmóvil y la presencia de una cápsula evidenciada en frotis directo de fluidos corporales y tejidos, pero no siempre demostrables en cultivos (Gillespie y Timoney, 1981; Nicolet, 1986; Joclik y Willett, 1991). El *C. perfringens* forma esporas, que pueden ser centrales o subterminales, de forma ovalada, y lo suficientemente pequeñas para no causar ensanchamiento del bacilo (Merchant y Packer, 1961; Dushesnes y Mainil, 2005). Además, algunas cepas de *C. perfringens* varían en su habilidad de esporular, necesitando generalmente de medios especiales para hacerlo (Barach *et al.*, 1974).

Macroscópicamente, *C. perfringens* desarrolla colonias de superficie larga, redonda, lisa, irregular y ligeramente opaca. Otros tipos de colonias observadas, incluyen algunas con centro opaco, levantado y de borde transparente, que es radialmente estriado (Cruickshan, 1965).

El *C. perfringens* es un microorganismo anaerobio tolerante, y puede sobrevivir e incluso proliferar con tensiones de oxígeno que inhiben los clostridios denominados anaerobios estrictos (Joclik y Willett, 1991). Los clostridios no producen catalasa y sólo sintetizan niveles bajos de superóxido dismutasa. Se cree que una de las causas que sean anaerobios es que no tienen otra manera de liberarse de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}^{2-}$  que son tóxicos para ellos (Madigan *et al.*, 2001).

El *C. perfringens* crece bajo condiciones de anaerobiosis, teniendo un óptimo desarrollo a 45°C (Hatheway, 1990). El crecimiento en caldo carne



es rápido con producción de ácido y gas, teniendo un olor hediondo y mostrando la carne sin digestión y enrojecida (Cruickshan, 1965). Las colonias de *C. perfringens* crecidas sobre medio agar sangre usualmente muestran una característica zona de doble hemólisis alrededor de la colonia: una zona interna clara (hemólisis completa o tipo  $\beta$ ) debido a la toxina  $\theta$ ; y una zona externa nublosa (hemólisis incompleta o tipo  $\alpha$ ) debido a la toxina  $\alpha$ . En medio agar yema de huevo, las colonias son rodeadas por una ancha zona opaca circular, reconocida como la reacción de lecitinasa (Reacción de Nagler) debido a la toxina  $\alpha$ . En los medios enriquecidos con leche, casi todas las cepas del *C. perfringens* producen una “Fermentación Tormentosa”, debido a la fermentación de la lactosa, producción de gas, y coagulación, pero sin digerir la caseína (Hatheway, 1990; Jocklik y Willett, 1991).

Las características bioquímicas complementarias son: motilidad negativa, licuefacción de gelatina, reducción de nitrato, producción de  $H_2S$ , reducción de sulfito, indol negativo, lipasa negativo, ureasa negativo, catalasa y oxidasa negativo, y fermentación de una gran cantidad de azúcares (Merchant y Packer, 1961; Cruickshan, 1965; Cowan, 1974; Gillespie y Timoney, 1981; Nicolet, 1986; Jocklik y Willett, 1991).

- **Tipificación.**

Las cepas de *C. perfringens* son clasificadas en cinco tipos (A, B, C, D y E) en base a la producción de cuatro toxinas letales ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  y  $\eta$ ). Las cepas del tipo A producen la toxina  $\alpha$ ; las de tipo B producen toxinas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\epsilon$ ; el tipo C produce toxinas  $\alpha$  y  $\beta$ ; las del tipo D producen toxinas  $\alpha$  y  $\epsilon$  (Merchant y Packer, 1961; Cruickshan, 1965; Cowan, 1974; Gillespie y Timoney, 1981; Nicolet, 1986; Jocklik y Willett, 1991; Songer, 1996; Petit *et al.*, 1999; Quinn *et al.*, 2005). El siguiente cuadro ilustra los tipos de *C. perfringens* y las toxinas que producen.

Cuadro 1. Clasificación de tipos de *C. perfringens* en base a la presencia de sus cuatro toxinas (Pérez, 2005).

TIPO TOXINA	A	B	C	D	E	β2/enterotoxina
α	+	+	+	+	+	+/-
β	-	+	+	-	-	+/-
ε	-	+	-	+	-	+/-
I	-	-	-	-	-	+/-

(+) Producción de toxina; (-) Ausencia de toxina.

El método de tipificación clásica se basa en pruebas de neutralización toxina-antitoxina *in vivo*, empleando sobrenadantes de cultivos de *C. perfringens*, tratadas y no tratadas con tripsina. La tripsina es necesaria para activar, si estuviesen presentes, las toxinas ε y I; sin embargo, inactiva la toxina β; por lo que ambas muestras tratadas y no tratadas deben ser evaluadas. Luego estas muestras serán enfrentadas con y sin antisuero de cada tipo, para después ser inoculadas vía intradérmica en cobayos o intraperitoneal en ratones para evidenciar la seroneutralización toxina-antitoxina (Cruickshank, 1965; Nicolet, 1986; Hatheway, 1990; Songer, 1996). La respuesta en cobayos (dermonecrosis) es notada después de las 24 a 48 horas y en ratones (letalidad) a las 72 horas (Songer, 1996).

- **Toxinas Principales**

- a. **Toxina alfa (α)**

La toxina α o fosfolipasa C del *C. perfringens* fue la primera toxina bacteriana que mostró tener actividad enzimática (Rood y Cole, 1991).

La capa externa de la membrana celular eucariota es rica en fosfatidilcolina y esfingomielina, substratos preferidos de la toxina α, que al ser hidrolizados generan diacylglicerol y ceramida,

respectivamente (Titball *et al.*, 1999). El diacylglicerol es un importante segundo mensajero, activando proteinkinasa C (PKC), el cual activa fosfolipasas eucariotas, especialmente la A<sub>2</sub>, C y D, los productos de la fosfolipasa A<sub>2</sub> proveen de sustrato a la cascada de ácido araquidónico, resultando en la producción de tromboxanos, leucotrienos y prostaglandinas. La PKC también estimula la producción en células endoteliales del factor activador plaquetario (PAF) y proticiclinas. Todo esto resulta en constricción de vasos sanguíneos, incremento de la permeabilidad vascular, agregación plaquetaria y disfunción miocárdial, todos los cuales contribuyen a manifestaciones locales y sistémicas caracterizadas por un profundo shock y muerte (Songer, 1997; Titball *et al.*, 1999; Petit *et al.*, 1999; Gijón *et al.*, 2000).

En el año 2010, Pérez en un estudio sobre la caracterización de la toxina  $\alpha$  aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia durante los años 2007, 2008 y 2009 evidenciaron las distintas características toxigénicas independientes de la presencia de Cp-PLC, y sugiere, al parecer, que la Cp-PLC no sería un factor esencial del *C. perfringens* en la producción de lesiones entéricas en casos de enterotoxemias en alpacas (Pérez, 2010).

#### **b. Toxina beta ( $\beta$ )**

La toxina  $\beta$  es una exotoxina, presente en cepas *C. perfringens* del tipo A y C, que inducen inflamación, necrosis de la mucosa intestinal y es letal en ratones (Songer, 1996).

El mecanismo de acción de la toxina  $\beta$  es poco conocido. Sin embargo, la toxina  $\beta$  muestra una significativa homología, a nivel de aminoácidos, con la toxina  $\alpha$ , la toxina  $\gamma$  y lecuocidin de *Staphylococcus aureus*, las cuales oligomerizan y forman poros en membranas celulares eucariotas, sugiriendo que la toxina  $\beta$  podría tener una actividad similar, resultando en alteración de la permeabilidad de la membrana, y consecuente muerte celular (Rood

y Cole, 1991; Petit et al., 1999; Smedley et al., 2004; Duchesnes y Mainil, 2005).

#### **c. Toxina épsilon ( $\epsilon$ )**

La toxina  $\epsilon$  es una exotoxina producida por cepas de *C. perfringens* B y D, que posee actividad letal, necrotizante y edematizante (Hatheway, 1990; Songer, 1996; Rood, 1998; Petit et al., 1999; Smedley et al., 2004). La toxina  $\epsilon$  activada interactúa con receptores apropiados (probablemente proteínas glicosadas) en la membrana celular (Smedley et al., 2004). La toxina  $\epsilon$  no es internalizada; sino se une fuertemente a la membrana celular (Petit et al., 1999; Smedley et al., 2004) formando un largo complejo por interacción con una sola clase de proteínas de membrana (Petit et al., 1999). Este largo complejo es un heptámero que actúa como un poro no selectivo, alterando la permeabilidad de la membrana celular (Smedley et al., 2004).

#### **d. Toxina iota ( $\iota$ )**

Es una exotoxina producida por cepas del *C. perfringens* tipo E. Posee actividad dermonecrótica, causa alteración de la permeabilidad y es letal en ratones (Hatheway, 1990; Songer, 1996; Rood y Cole, 1991)

#### **e. Enterotoxina del *C. perfringens*: CPE**

La enterotoxina del *C. perfringens* (*C. perfringens* enterotoxin: CPE) es una endotoxina sintetizada solo durante la fase de esporulación, la cual induce una significativa secreción de agua e iones en enterocitos, provocando descamación y acortamiento de las microvellosidades intestinales (Rood y Cole, 1991; Rood, 1998; Petit et al., 1999; Smedley et al., 2004). La CPE es producida por menos del 5% de la población de *C. perfringens* (Rood, 1998; Petit et al., 1999; Smedley et al., 2004), principalmente por cepas tipo A (Hatheway, 1990; Rood y Cole, 1991; Rood, 1998; Petit et al., 1999;

Smedley et al., 2004) aunque también por cepas tipo C y (Hatheway, 1990; Rood, 1998; Petit et al., 1999) y solo pocas cepas tipo D y E han mostrado producirla (Hatheway, 1990; Petit et al., 1999).

La CPE se une a un receptor proteináceo presente en la membrana citoplasmática del borde de ribete del enterocito. Después de la unión con su receptor forman el “complejo pequeño” que se inserta en la membrana celular (Rood y Cole, 1991; Smedley et al., 2004). Este complejo per se no es suficiente para inducir citotoxicidad. Por lo que, inmediatamente el “complejo pequeño” se une a otra proteína de membrana para formar el “gran complejo”, complejo que tiene propiedades tipo poro, permitiendo el libre pasaje de moléculas a través de la membrana, y conduciendo a la alteración de su permeabilidad. Finalmente, causa un colapso coloidosmótico y la muerte celular (Rood y Cole, 1991; Songer, 1996; Petit et al., 1999; Smedley et al., 2004)

Inicialmente la toxina  $\alpha$  fue considerada como el principal factor de virulencia involucrado en cuadros enterotoxémicos por *C. perfringens* tipo A (Moro, 1971; Moro, 1987). Sin embargo, estudios realizados por Ramírez en el año 1987 demostraron que la producción de la CPE, durante la fase de esporulación por algunas cepas del *C. perfringens* tipo A, con deficiente capacidad de producción *in vitro* de la toxina  $\alpha$ , aisladas en casos típicos de enterotoxemia en crías de alpacas. Asimismo, ensayos de intestino ligado en llamas jóvenes inoculadas con cepas enterotoxigénicas esporuladas, provocaron acumulación de fluidos y presencia de gas en los segmentos intestinales en experimentación, así como también la aparición de algunos signos clínicos (postración, ligera lagrimación y congestión de mucosas). Además, la CPE pudo ser evidenciada serológicamente en el contenido intestinal mostrando a la CPE como principal factor de virulencia involucrado en el desarrollo de la enfermedad (Ramírez, 1987; Ramírez, 1988; Ramírez y Ellis, 1988).

Posteriormente Pérez en el año 2006 encontró básicamente a la toxina  $\alpha$  y posiblemente a la toxina  $\beta_2$ , como los principales factores de virulencia asociados a la enterotoxemia en crías de alpacas, reportándose solo un caso de *C. perfringens* con gen *cpe* codificante de la CPE. Estos hallazgos nuevamente vuelven a crear dudas sobre que rol cumple sobre la patogenia de la enfermedad (Pérez, 2006).

#### **4.2 Epidemiología.**

La presentación de la Enterotoxemia en alpacas es de forma epizootica durante la parición, y está relacionada a factores climáticos, con especial importancia la abundante lluvia, además de deficiencias en el manejo e higiene (Ramírez *et al.*, 1985; Moro, 1987, Ramírez, 1989b; Ameghino y De Martini, 1991; Solís, 1997; Bustinza *et al.*, 2000).

La presentación de la enfermedad provoca elevadas y variables tasas de mortalidad neonatal en alpacas y llamas tanto en pequeñas comunidades alpaqueras, así como en centros experimentales y grandes empresas alpaqueras, reportándose tasas anuales de mortalidad neonatal debido a enterotoxemia de: 0.6 a 48.9% en la estación experimental “La Raya” en Puno durante los años 1973-1979 (Ramírez *et al.*, 1985; Ramírez, 1989b), con un 24.16%, como promedio, en doce fundos alpaqueros en Puno durante los años 1972-1973 (Carvajal, 1974), 5.11 a 25.81 % en doce fundos alpaqueros de Puno en 1974 (Bustinza *et al.*, 2000), y un estimado de 70% en medianos criadores alpaqueros en Cusco en 1980 (Ramírez *et al.*, 1985).

El comportamiento de las presentaciones epizooticas de la enfermedad describe una secuencia cíclica, con rangos entre elevadas y bajas tasas de mortalidad neonatal, varias veces. El ciclo es usualmente de cinco años (+/- 1 año) en hatos individuales. Esta ciclicidad posiblemente se deba a la variación en la transferencia de anticuerpos específicos de la madre hacia la cría durante la presentación de las epizootias (Ramírez *et al.*, 1985; Ellis, 2006).

- **Factores relacionados al huésped:**

La enterotoxemia afecta principalmente a crías de alpacas y llamas entre los 3 a 80 días de edad, siendo entre las 2 a 3 semanas la etapa de mayor susceptibilidad (Moro, 1971; Ramírez *et al.*, 1985; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991; Fowler, 1998; Bustinza *et al.*, 2000). Paradójicamente, se ha observado que son las crías de buena condición corporal las más susceptibles a desarrollar la enfermedad (Moro, 1971; Ramírez *et al.*, 1985; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991; Bustinza *et al.*, 2000). La enfermedad afecta tanto a crías de raza Suri y las de pelaje de color blanco como a las de raza Huacaya y las de pelaje de otros colores (Ramírez *et al.*, 1985; Ameghino y De Martini, 1991; Bustinza *et al.*, 2000).

Además, se sabe que las alpacas nacen con una cantidad baja de proteínas en su suero (6.4 mg/ml), y esta disminuye aún más en las dos primeras semanas de edad (5.7-5.8 mg/ml), para luego aumentar progresivamente conforme avanza la edad. Contrariamente, la gammaglobulina que al nacimiento es 1.4 mg/dl desciende a 0.98, 0.76 y 0.79 mg/ml a los 8, 15 y 22 días, respectivamente, y es precisamente a esta edad que las crías muestran una mayor susceptibilidad a enfermarse por enterotoxemia (Ramírez *et al.*, 1985).

- **Factores relacionados al medio ambiente:**

La época de parición siempre es programada para los meses de enero a marzo, periodo que coincide con los meses de precipitación pluvial intensa, el cual favorece al crecimiento y desarrollo de pastos. Además, una desproporcionada composición del número de crías y madres en relación al área de pastoreo dará lugar a un incremento de materia orgánica de desecho (Ramírez *et al.*, 1985).

Esta asociación, abundantes lluvias, hacinamiento y animales susceptibles estaría favoreciendo a la presentación de epizootias de

enterotoxemia, debido a que la extrema humedad del suelo contribuye a la presencia, multiplicación y modificación biológica de esporas y células vegetativas de *C. perfringens*. Así como, la extrema variación de la temperatura (Máxima: 14°C; Mínima: 3°C), que deben soportar las crías a pocos días de haber nacido (Ramírez *et al.*, 1985).

#### **4.3 Patogenia.**

La principal vía de ingreso del *C. perfringens* es la oral. Es probable que las crías ingieran una masiva cantidad de esporas y/o células vegetativas del clostridio (Ramírez *et al.*, 1985; Ramírez *et al.*, 1988). Posteriormente, en el lumen intestinal un ligero pH alcalino y el incremento de carbohidratos en la dieta (cambio de dieta, inicio de consumo de forraje) (Ramírez y Ellis, 1988) o una excesiva ingestión de leche que ocasione indigestión (Ameghino y De Martini, 1991), favorecerían el desarrollo de un ambiente óptimo para la multiplicación y esporulación del *C. perfringens* tipo A, sintetizándose la toxina  $\alpha$  y la CPE (Ramírez y Ellis, 1988; Ameghino y De Martini, 1991). Una vez sintetizadas las toxinas, posiblemente la CPE, en el lumen intestinal provoca alteración de la permeabilidad de la pared intestinal resultando en acumulación de fluidos y electrolitos dentro del lumen, así como la absorción de toxinas al torrente sanguíneo (Ramírez *et al.*, 1988). El animal, probablemente, muera por acidosis metabólica de carácter fatal por la pérdida de la reserva alcalina de la sangre y tejidos hacia el lumen intestinal. Asimismo, puede haber muerte por shock debido a que las toxinas afectan las neuronas (Ameghino y De Martini, 1991).

Además, ha sido establecida una relativa asociación entre pH fecal, el inicio de consumo de pasturas nativas y la excreción de CPE y de *E. coli*, siendo mayor los aislamientos de *E. coli*, cuando el pH fecal fue ligeramente alcalino, asociado al consumo de pastura. Sin embargo, la CPE fue detectada en niveles muy bajos en muestras de heces de alpacas neonatas clínicamente sanas (Rivera y Ramírez, 1999).



En un estudio realizado por Rosadio *et al.*, de una población de 108 animales muertos por enterotoxemia, se encontró en el 31% de las muestras la presencia de abundantes estructuras parasitarias correspondientes a formas inmaduras de *Eimeria macusaniensis*, comprometiendo la mucosa y el epitelio de las glándulas crípticas en yeyuno e íleon. En los 108 casos se aisló *C. perfringens* (Rosadio *et al.*, 2012) y la prueba de PCR múltiple amplificó genes de la toxina  $\alpha$  (tipo A) y en 19 de estos, adicionalmente, se detectó la presencia del gen *cpb2* (Pérez, 2006).

La coexistencia de eimeriosis en casos de enterotoxemia y diarreas fatales ha sido previamente reportada (Rosadio y Ameghino, 1994; Palacios *et al.*, 2006); de allí que la identificación de estructuras parasitarias similares asociadas a cambios patológicos intestinales en el 30% de los casos estudiados, permiten indicar que las infecciones por *Eimeria* podrían ser uno de los factores desencadenantes o predisponentes para el establecimiento de la enterotoxemia de la alpaca (Rosadio *et al.*, 2012).

El *C. perfringens* y algunas especies de *Eimeria*, en forma independiente, pueden establecerse y causar infecciones agudas fatales en animales neonatos; pero la coexistencia de ambos patógenos en el ambiente intestinal puede resultar en un aumento de las capacidades patológicas de cualquiera de estos agentes o uno de ellos predisponer la mayor capacidad infectiva del otro. En esta posible interacción, el *Clostridium* parecería no ser el agente predisponente a infecciones eimeriales, pues la destrucción de los enterocitos podría reducir la población celular necesaria para mantener una adecuada replicación coccidial. Sin embargo, los efectos citopáticos inherentes a la multiplicación coccidial, podría muy bien facilitar los nutrientes necesarios para iniciar la multiplicación bacteriana y la subsecuente producción y absorción de toxinas potencialmente patogénicas (Rosadio *et al.*, 2012).

#### 4.4 Signos Clínicos.

La muerte súbita puede, muchas veces, ser el único signo encontrado. Los signos clínicos y su intensidad van a depender de la cantidad de toxinas presentes en el organismo. Las crías afectadas muestran depresión, anorexia, permanecen postradas y alejadas de su madre con las orejas dirigidas hacia atrás, los ojos cerrados y los miembros estirados. Luego, el cuadro progresa y las crías aparecen con los miembros anteriores estirados, la cabeza apoyada sobre el suelo, el abdomen distendido y emiten quejidos posiblemente debido al dolor abdominal. Algunas ingieren abundante cantidad de agua (polidipsia) y otras presentan apetito depravado (polifagia) que se manifiesta por la ingestión de arena, piedrecillas, etc. del suelo. La temperatura tiende a ser normal, pero a veces sobrepasa los 40°C, y suelen echarse centralmente en los arroyos y charcos de agua. La temperatura disminuye notablemente (hipotermia) en estado agónico. El cuadro toxémico, en su etapa final, causa alteraciones nerviosas tales como convulsiones, opistótonos. Finalmente, el animal entra en coma y muere (Moro, 1971; Ramírez *et al.*, 1985; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991; Ramírez *et al.*, 1988; Fowler, 1998; Bustinza *et al.*, 2000).

La diarrea está ausente en la mayoría de crías que desarrollan la enfermedad, siendo la constipación el signo más frecuente encontrado (Moro, 1971; Ramírez *et al.*, 1985; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991; Ramírez *et al.*, 1988). Sin embargo, algunas crías pueden presentar descargas diarreicas posiblemente asociadas a infecciones mixtas con *Escherichia coli* u otros organismos enteropatógenos (Ramírez *et al.*, 1988; Fowler, 1998). Estas crías raramente mueren, posiblemente debido a que eliminan las toxinas en las descargas diarreicas (Moro, 1971; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991).

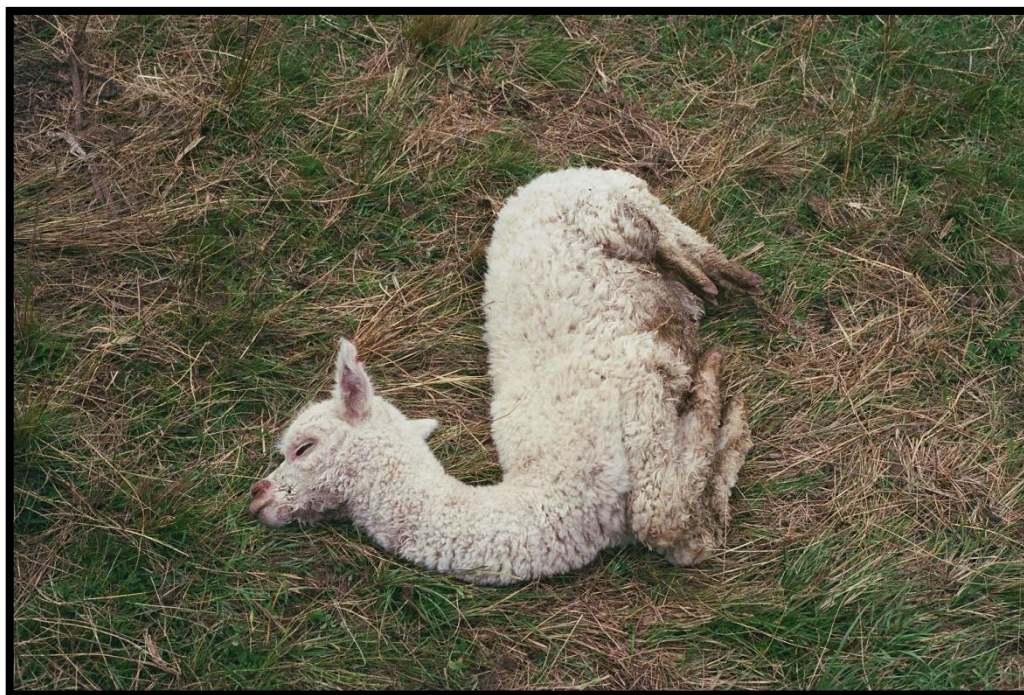


Figura 5. Animal con evidente sintomatología nerviosa (opistótonos). Macusani 2007. (CONOPA)

#### 4.5 Lesiones Anatomopatológicas.

Externamente, la carcasa se observa, usualmente, en buena condición muscular con el abdomen distendido por la presencia de gas en los intestinos. El tejido subcutáneo puede estar congestionado y presentar hemorragias petequiales (Ramírez *et al.*, 1988; Fowler, 1998). En cavidad torácica, el lumen de la tráquea y los bronquios con contenido espumoso que algunas veces se encuentra acompañado de ingesta. Los pulmones aparecen congestionados y edematosos (Ameghino y De Martini, 1991; Ramírez *et al.*, 1988; Fowler, 1998). Los nódulos linfáticos torácicos están incrementados de tamaño y hemorrágico; Ramírez *et al.*, 1988; Fowler, 1998). El timo se presenta congestionado y con hemorragias petequiales en su superficie (Ameghino y De Martini, 1991; Ramírez *et al.*, 1988; Oha, 1994; Fowler, 1998;). En el corazón, las arterias coronarias se encuentran dilatadas y las aurículas presentan petequias en su superficie (Moro, 1971; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991; Ramírez *et al.*, 1988; Oha, 1994; Fowler, 1998).



Figura 6. Necropsia de una cría con aparente enterotoxemia, nótese los intestinos de coloración rojiza e incluso oscura. Macusani 2007. (CONOPA)

Al explorar la cavidad abdominal, es perceptible un olor desagradable y característico de la enfermedad (Ameghino y De Martini, 1991; Ramírez *et al*, 1988). Los intestinos están distendidos con fluido acuoso, cuyo color varía de acuerdo al tipo de ingesta, pudiendo ser blanquecino, amarillento, verdoso y aún plumizo (Moro, 1971; Moro, 1987; Ramírez *et al*, 1988). El intestino delgado, particularmente yeyuno e íleon, se encuentran congestionados (Moro, 1971; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991; Fowler, 1998) y hemorrágico (Ameghino y D Martini, 1991; Oha, 1994). En intestino grueso se presentan hemorragias focales con zonas de impacción conteniendo heces duras (Oha, 1994). Las placas de Peyer se encuentran inflamadas, siendo más notorio en el intestino grueso (Ameghino y De Martini, 1991; Fowler, 1998).

El bazo a veces esta aumentado de tamaño (Moro, 1971; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991). El hígado se encuentra

aparentemente normal, pero algunas veces congestionado (Ameghino y De Martini, 1991; Oha, 1994; Ramírez *et al.*, 1998) y a veces, hemorragias petequiales en su superficie (Oha, 1994). La vejiga generalmente se encuentra distendida debido a la acumulación de orina como consecuencia probablemente de parálisis. El encéfalo se presenta severamente congestionado y es notorio el acumulo de líquido cefalorraquídeo entre las meninges (Ramírez *et al.*, 1998; Fowler, 1998).

Palacios en el 2004, en un estudio de caracterización anatomopatológica de lesiones entéricas en crías muertas de alpaca con cuadros clínicos compatibles con enterotoxemia, describe las siguientes lesiones anatomopatológicas en duodeno: enteritis catarral (100%); en yeyuno: enteritis hemorrágica (26.7%), panenteritis hemorrágica (26.7%), enteritis necrótica (16.6%); en íleon: enteritis necrótica (56.6%), enteritis hemorrágica (20%), enteritis fibrinosa (13.3%) ; en ciego: tiflitis catarral (40%), tiflitis necrótica (26.7%), tiflitis fibrinosa m(13.3%); en colon: colitis catarral (63.3%), colitis necrótica (39%), colitis hemorrágica (10%), colitis fibrinosa (16.7%).

#### **4.6 Lesiones Histopatológicas.**

Palacios (2004), realiza descripción de las siguientes lesiones histopatológicas. En duodeno: enteritis necrótica (90%), enteritis catarral (10%); en yeyuno: enteritis necrótica (69%), panenteritis necrótica hemorrágica (20%), enteritis necrótica hemorrágica (13.3%), panenteritis necrótica supurativa (6.7%); en íleon: enteritis necrótica (70%), enteritis fibrinonecrótica (13.3%), panenteritis necrótica hemorrágica (6.7%), enteritis necrótica supurativa (6.7%), panenteritis necrótica supurativa (3.3%); en ciego: tiflitis necrótica (46.7%), tiflitis muconecrótico (20%), tiflitis fibrinonecrótico (13.3%), tiflitis catarral (10%), tiflitis mucocatarral 6.7%), tiflitis necrótica hemorrágica (3.3%); en colon: colitis necrótica (46%), colitis muconecrótica (20%), colitis catarral (16.7%), colitis necrótico hemorrágico (6.7%).

Además, Oha (1994) describe lesiones histopatológicas en diferentes órganos de crías muertas de alpacas con enterotoxemia, encontrando en pericardio: congestión pericárdica aguda (86.67%) y pericarditis aguda (13.3%); en el corazón: congestión miocárdica (53.33%), miocarditis hemorrágica (40%), miocarditis aguda (6.67%); en timo: timitis hemorrágica (46.47%), congestión tímica (33.33%), timitis fibrinosa (20%); en ileon: ileitis regional hemorrágica (100%); en colon: colitis catarral aguda (53.33%) y colitis hemorrágica (47.67%); en hígado: congestión hepática aguda (40%) y conlagitis supurativa (13.33%); en ganglio linfático mesentérico: hipoplasia nodular mesentérica (40%) y linfadenitis mesentérica hemorrágica (60%); en riñones: nefritis tubular degenerativa (57.67%), nefritis hemorrágica (36.67%), pielonefritis supurativa (3.33%), degeneración grasa (3.33%); en vejiga: congestión vesical (53.33%), cistitis catarral aguda (46.67%).

#### **4.7 Diagnóstico de laboratorio.**

Actualmente, para el diagnóstico de la enterotoxemia en alpacas se debe considerar los siguientes criterios: 1) identificar la magnitud del problema en el campo mediante la identificación de las características epidemiológicas de la mortalidad de las crías enfermas y muertas, signos clínicos y lesiones anatómicas patológicas; 2) efectuar el reconocimiento de esporas y/o bacilos esporulados en fróntes directos de contenido de intestino delgado (ileon y yeyuno) teñidos con coloración específica para esporas; 3) detectar serológicamente y/o biológicamente las toxinas implicadas en la enfermedad en fluidos corporales (exudado peritoneal o pericárdico) o líquido cefalorraquídeo de las crías muertas para llegar a un diagnóstico definitivo. Con este propósito han sido desarrolladas varias pruebas inmunológicas que varían desde una alta especificidad, como ELISA, hasta una baja especificidad, como la prueba de inmunodifusión doble (Ramírez, 1988; Ramírez y Ellis, 1988; Ramírez, 1989a; Ramírez, 1990; Ramírez *et al.*, 1998).



Métodos convencionales, como el cultivo bacteriológico en anaerobiosis, pueden ser incluidos en el diagnóstico de la enfermedad. Generalmente es posible aislar abundante cantidad de *C. perfringens* de contenido intestinal, linfonódulos mesentéricos, músculos, corazón e hígados (Ramírez *et al*, 1998). Sin embargo, la mejor muestra a enviarse al laboratorio de diagnóstico es un fragmento de intestino delgado (íleon) de unos 20 cm de longitud ligados a sus extremos. Este fragmento de intestino se pone en un frasco de boca ancha que contiene bórax en polvo, o sino en glicerol tamponado (Moro, 1971; Moro, 1987).

Se debe igualmente remitir muestras fijadas en formol para identificar posibles causas o factores desencadenantes tales como eimeriosis intestinal.

#### **4.8 Tratamiento.**

En la actualidad no se dispone de un tratamiento satisfactorio contra la enterotoxemia en alpacas, debido a que no existe ningún protocolo farmacológico de uso práctico que actúe contra las toxinas en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, los animales que presentan diarrea debido a infecciones mixtas pueden tratarse para reducir la carga bacteriana, y así evitar que se sigan difundiendo en los campos (Ameghino y De Martini, 1991; Ramírez *et al.*, 1998). Asimismo, las crías que no presenten diarrea se les podría administrar algún laxante, como sulfato de magnesio, para favorecer la expulsión de las bacterias y sus toxinas (Ameghino y De Martini, 1991).

#### **4.9 Control**

Establecida la epizootia en el rebaño se hace necesario cambiar de lugar los dormideros, y en lo posible, cambiar también las canchas o parideros, a lugares más alejados (Moro, 1971; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991). Aunque, todos estos procedimientos han demostrado

prevenir brotes (Diego Castillo, comunicación personal) parece no influye significativamente en la reducción de la mortalidad una vez establecida la epizootia (Melo *et al*, 1999). Una posible explicación de esta inefectividad sea que en pleno brote los animales están desarrollando problemas de salud intestinal, por ejemplo, infecciones coccidiales. Tradicionalmente se acostumbra la administrar antibióticos por vía oral y/o sistémica a todas las crías del rebaño afectado durante 3 días consecutivos, también con resultados contradictorios (Moro, 1971; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991).

#### **4.10 Prevención**

La prevención está dada básicamente por medidas inmuno profilácticas a través del uso de vacunas tipo anacultivos de *C. perfringens*, asociados a adecuadas medidas de manejo (higiene de corrales) para hacerlas más efectivas (Moro, 1971; Moro, 1987).

Con esa premisa, en el 2005 se publicó un estudio de 3 años sobre prevención contra la enterotoxemia de las alpacas, usando vacunas (anacultivos) conteniendo componentes bacterias de los tipos *C. perfringens* tipo A, B, C y D con sus respectivas toxinas inactivadas, la vacuna fue aplicada a madres y crías, mostrando una significativa reducción de la mortalidad neonatal debido a enterotoxemia en un 19.5% a 1% demostrando su utilidad en campo (Yaya y Rosadio, 2005).

También, se ha demostrado que un toxoide elaborado a partir de CPE indujo producción de anticuerpos anti-CPE en la madre, apareciendo tanto en calostro como en el suero del recién nacido (Ramírez, 1990); pero su efectividad no ha podido ser demostrada aún en campo (Ellis, 2006).

Estudios de prevención en base a antibióticos (Ampicilina + sulfato de colistina), administrados vía parenteral hasta la onceava semana de



edad demostraron no tener efecto significativo en la prevención de la enfermedad (Pezo et al., 1999).

A pesar de que la coexistencia de eimeriosis e infecciones clostridiales ha sido constantemente observado en el campo, no existe literatura disponible sobre uso sistemático de drogas coccidiostáticas y/o coccidicidas en el control o prevención de la enterotoxemia. En la sierra central del país se ha usado programas de vacunación y uso de un coccidicida en las crías a base de toltrazuril con resultados aparentemente prometedores (CONOPA, comunicación personal).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

La parte experimental del presente estudio cuenta de dos fases: la primera destinada a la estandarización de la curva de cinética de Inmunoglobulina G, y la segunda a la búsqueda de los casos y controles.

#### **1. Fase I: Estandarización de la Curva de Cinética de degradación de inmunoglobulina G**

##### **1.1 Lugar de ejecución:**

La recolección de muestras de sangre de alpacas neonatas se realizó en el Centro de Investigación y Producción CIP-La Raya en el Departamento de Puno. El procesamiento de las muestras se realizó en las instalaciones de la Unidad de Biología y Genética molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

##### **1.2 Animales:**

Se formó un grupo conformado 6 crías, los cuales siguieron una secuencia de edad en días para la extracción de las muestras de sangre, la cual fue:

- 2, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 18 y 21 días de edad.

Se consideraron ciertos criterios a la hora de elegir a los animales:

- **Criterios de inclusión**

Se consideraron animales sin diferencia de sexo, que hayan consumido calostro (lo cual se verificó al estar presente al momento del nacimiento y horas después), considerados sanos mediante evaluación clínica.

- **Criterios de exclusión**

Animales mayores a los 2 días de edad, que no hayan consumido calostro, o con signos de enfermedad y/o debilidad.

### **1.3 Procedimiento de muestreo**

Se tomó una muestra promedio de 1.5 mL de sangre de los animales seleccionados mediante punción de la vena yugular o femoral. Las muestras fueron rotuladas indicando los datos del animal, fecha y localización.

### **1.4 Procesamiento de Muestra**

#### **a. Obtención del suero.**

Las muestras fueron centrifugadas a 6000rpm durante 5 minutos para la obtención del suero, los cuales fueron conservados a una temperatura de -20°C hasta el momento del análisis.

#### **b. Cuantificación o Análisis de IgG.**

Las muestras de suero, fueron evaluadas con el fin obtener los datos de concentración de IgG (mg/dl) utilizando para ello un kit de Inmunodifusión radial (IDR) (triple J, USA). Cada kit de IDR contiene 24 pocillos y tres sueros estandarizados con diferentes concentraciones de IgG (212 mg/dL, 1493mg/dL, y 2939mg/dL), los cuales también son sometidos a la prueba.

Las muestras de suero fueron descongeladas a temperatura ambiente antes de someterlas a la prueba. Una vez descongeladas, se

homogenizaron las muestras y se procedió a tomar 5  $\mu$ L de cada muestra anotándose la hora y el número de pocillo donde fue depositada. Posteriormente se colocaron las placas en un lugar de poca humedad a una temperatura de 24°C aproximadamente por 24 horas, finalizando con la lectura de las placas.

Para la lectura de cada pocillo que contenía una muestra determinada se tomó una regla milimétrica para observar el halo de precipitación (en mm) como observamos en la Figura 7, el cual mediante un cuadro comparativo (realizado en Microsoft excell 2007) y los datos de los sueros estándar que incluían en cada placa se procedió a estimar las concentraciones de cada muestra.



Figura 7. Kit de Inmunodifusion Radial (IDR) para Inmunoglobulina G (IgG) de camélido, nótese los halos de precipitación de cada pocillo indicando la concentración de IgG de cada muestra. 2010.

## **1.5 Análisis estadístico:**

### **Regresión Exponencial:**

Una vez obtenidos los datos de las concentraciones de IgG en las alpacas neonatas se procedió a formar la curva de cinética de Inmunoglobulina G para formar la ecuación de regresión exponencial:

$$Y = ae^{bx}$$

Y = variable dependiente (IgG)

X = variable independiente (edad)

a = intercepto

b = pendiente

El objetivo fundamental de esta fase fue, en primer lugar, determinar si dichas variables muestran una asociación de dependencia una con respecto a la otra variable y en segundo lugar, establecer una referencia para determinar posibles casos de FTP en la segunda fase de este estudio.

## **2. Fase II: Animales Sanos y Muertos por Enterotoxemia (Casos y Controles)**

### **2.1 Lugar de ejecución:**

La recolección de diferentes muestras se realizó en comunidades y centros de producción alpaquera de Puno y Cuzco, con altitudes mayores a los 3500 msnm, así como en la estación experimental CIP-La Raya de la Universidad Nacional del Altiplano durante la época de verano de los años 2007, 2008, 2009 y 2010, fechas donde se presentó la enfermedad en distintos lugares. El procesamiento y análisis de las mismas se realizaron en los ambientes de la Unidad de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

## **2.2 Animales:**

- **Animales Controles (Sanos)**

### **Criterios de inclusión**

Se considerará animales sanos de preferencia entre 10 a 21 días de edad, sin diferencia de sexo y raza, que procedan de lugares donde ocurran brotes de enterotoxemia.

### **Criterios de exclusión**

Animales mayores a los 30 días de edad, diagnosticados sanos mediante examen físico, que hayan recibido tratamiento previo.

- **Animales Casos (Muertos por enterotoxemia)**

### **Criterios de inclusión**

Se considerará animales enfermos o muertos, entre 10 a 21 días de edad, sin diferencia de sexo, procedentes de zonas con brotes de enterotoxemia y mediante evaluación física de los signos y lesiones sea compatible a enterotoxemia.

### **Criterios de exclusión**

Animales menores a 5 días o mayores a los 30 días de edad, que hayan tenido tratamiento previo, y que mediante evaluación física o necropsia no correspondan a cuadros de enterotoxemia.

### **Criterios de eliminación**

Animales que no dieron positivo al diagnóstico de laboratorio para enterotoxemia.

Cabe recalcar que era indispensable tener la mayor exactitud posible con lo que respecta a la edad de los animales por ser uno de los datos necesarios para la determinación de la FTP. Por ello se seleccionó a los animales cuyos datos mostraban o bien fecha de nacimiento y fecha de necropsia o marcada la edad exacta en días en su registro y/o ficha de necropsia.

A partir de las muestras obtenidas se realizó el análisis de laboratorio para determinar la presencia del *C. perfringens*, el cual consta de:

#### **Necropsia y toma de muestras:**

Se recolectaron diversas muestras de tejidos en necropsia de los animales muertos sobre todo muestras de intestino ligado, y conservadas en bolsas que contienen bórax para su conservación.

#### **Cultivo y recuentos bacterianos:**

De las muestras de intestino ligado contenido en bolsas herméticas con un deshidratante (Bórax) se cultivaron el contenido de pequeños segmentos (4 cm<sup>2</sup>) en medios líquidos (caldo tioglicolato) luego fueron incubados en condiciones de anaerobiosis a 37° C durante 48 horas. Luego, alícuotas del medio incubado se sembraron en agar tripticasa soya suplementada con 5% de sangre de ovino desfibrinada estéril, y se incubaron en condiciones de anaerobiosis a 37° C durante 48 horas. Para la identificación del *C. perfringens* se utilizaron los siguientes criterios: Crecimiento bajo condiciones de anaerobiosis, morfología de la colonia, formación característica de doble hemólisis, morfología de la bacteria, afinidad por la coloración gram y capacidad de reducción de sulfito y actividad lecitinasa. También mediante estudios de ELISA se pudo cuantificar los niveles de toxina  $\alpha$  en las muestras de intestino para así, de acuerdo a la cantidad de toxina determinar el grado de toxemia que podría haber cursado cada animal.

Estos análisis, adicionados con los hallazgos de necropsia y la evaluación de signos clínicos que pudieron ser observados, ayudaron a determinar la causa de mortalidad en los animales.

### **2.3 Tamaño de muestra para Estudio Caso - Control**

Se formaron 2 grupos de animales basados en la presencia o ausencia del evento (muerto por enterotoxemia), buscando determinar y

cuantificar la asociación entre FTP y mortalidad por enterotoxemia en alpacas neonatas. El tamaño muestral para cada uno de los grupos se obtuvo mediante el uso de la siguiente fórmula.

$$n = \frac{[Z\alpha \sqrt{2p(1-p)} + Z\beta \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)}]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

Donde:

$Z\alpha$  = Valor Z correspondiente al riesgo deseado: 95% o 1.96

$Z\beta$  = Poder: 80% o 0.2

$p_1$  = Valor de la proporción en el grupo controles: 0.15

$p_2$  = Valor de la proporción en el grupo casos: 0.50

$p$  = Media de las dos proporciones  $p_1$  y  $p_2$

Siendo:  $n = 27$  para cada grupo

## 2.4 Procedimiento de muestreo

Para los animales sanos y enfermos, se recolectaron muestras 1.5 mL de sangre de los animales seleccionados, vía vena yugular. Las muestras fueron rotuladas indicando los datos del animal, lugar y fecha. Paso siguiente fueron centrifugadas para la obtención del suero el que fue conservado en congelación hasta el momento del análisis.

## 2.5 Cuantificación de Inmunoglobulina G

Obtenidas todas las muestras de suero, éstas fueron evaluadas para obtener los datos de concentración de IgG (mg/dL) utilizando un kit de Inmunodifusión radial (triple J de los laboratorios Kent).

La determinación de probables casos positivos de FTP tomó como referencia las concentraciones obtenida con la ecuación de la curva previamente formada a lo largo de los primeros 21 días, los cuales nos indican la dinámica de degradación de IgG en animales aparentemente sanos. Los niveles de concentración de IgG animales sanos y enfermos de la segunda fase de este estudio fueron comparados con las



concentraciones determinadas por la ecuación de la curva. Animales por debajo de los valores establecidos por la ecuación fueron considerados como casos de FTP parcial.

## 2.6 Análisis estadístico

- **Análisis de datos por Regresión Exponencial:**

Una vez obtenidos los datos de las concentraciones de IgG en las alpacas neonatas se procedió a aplicar la ecuación de la regresión exponencial que se obtuvo en la primera fase del proyecto mediante Microsoft Excell 2007 cuya opción de gráfica de dispersión nos ayudará a mostrar una línea de tendencia y la ecuación correspondiente:

$$Y = ae^{bx}$$

Y = variable dependiente (IgG)

X = variable independiente (edad)

a = pendiente

b = intercepto

- **Estudio para la estimación de asociación: (Estudio tipo Caso control)**

Para cuantificar la magnitud de la asociación entre FTP y mortalidad neonatal por enterotoxemia se utilizó la fórmula para estimar el Odds Ratio (considerando IC 95%):

$$OR = \frac{a \times d}{b \times c}$$

$$IC = (OR) \exp (\pm 1.96\sqrt{1/a + 1/b + 1/c + 1/d})$$

Donde:

- OR es la estimación puntual del Odds ratio
- exp es la base del logaritmo natural elevada a la cantidad entre paréntesis.
- a, b, c y d representan los valores numéricos de la tabla de 2 x 2

Cuadro 2. Tabla 2x2 utilizado para el Odds Ratio.

	<b>Muertos por Enterotoxemia (+)</b>	<b>Sanos en Brote Enterotoxemia (-)</b>	<b>total</b>
<b>FTP (+)</b>	a	b	a+b
<b>FTP (-)</b>	c	d	c+d
<b>total</b>	a+c	b+d	

### 3. Equipo y material para el trabajo de campo

- Indumentaria de trabajo (Botas, Mameluco).
- Cooler.
- Guantes descartables.
- Jeringas de 5, 10 y 20 ml.
- Tubos Vacutainer de 6 y 10 ml.
- Agujas Vacutainer (21 G x 1”).
- Algodón.
- Alcohol 90%.
- Yodopovidona.
- Tubos eppendorf de 2 ml.
- Pipetas Pasteur descartables.

### 4. Equipo y material para el trabajo de laboratorio

- Micropipeta de 10 µl

- Tubos eppendorf de 2 ml.
- Tips para micropipeta de 10  $\mu$ l
- Placas de Inmunodifusión radial simple con anticuerpos para IgG de Camélido sudamericano.
- Regla milimetrada calibrada en 0,1 mm,
- Centrífuga
- Congeladora -20°C.
- Guantes.
- Cabina de Flujo Laminar.

#### IV. RESULTADOS

##### 1. Fase I: Ecuación de la curva de cinética de Degradación de la IgG en Alpacas Neonatas

Los resultados obtenidos de acuerdo a la metodología utilizada en primera parte del proyecto fueron los siguientes

Cuadro 3. Resultados de las concentraciones (mg/dL) de IgG por día en crías de alpacas sanas. El cuadro indica las concentraciones de IgG en los días 2, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 18 y 21 de edad de seis crías de alpaca con la finalidad de observar la cinética de degradación de IgG en alpacas neonatas.

Edad en días	Concentración de IgG (mg/dL)					
	Cría 1	Cría 2	Cría 3	Cría 4	Cría 5	Cría 6
<b>2</b>	4294.64	3022.95	1493.00	2538.78	3300.50	4798.16
<b>3</b>	3022.95	3816.94	1815.78	2457.00	3816.94	4798.16
<b>5</b>	1939.25	3300.50	1493.00	2538.78	2457.00	2939.01
<b>7</b>	1939.25	2939.01	1493.00	1975.00	2457.00	2538.78
<b>9</b>	1492.98	2538.78	1182.86	1493.00	1975.00	2164.37
<b>12</b>	1492.98	2164.37	1182.86	1236.80	1493.00	2164.37
<b>15</b>	899.70	2164.37	899.70	1236.80	1236.80	1493.00
<b>18</b>	643.49	1939.25	745.74	1066.00	1815.78	1182.86
<b>21</b>	366.19	1492.98	971.10	852.50	852.50	1009.73

En la Figura 8 se observa como los valores del cuadro 3 son sometidos a un gráfico de dispersión, mostrando la ecuación de regresión exponencial, con un  $R^2$  igual a 0.6082. La Figura 9 muestra la formación de la curva en función a la ecuación y los valores relativos por día a partir del día 2 hasta el día 21.

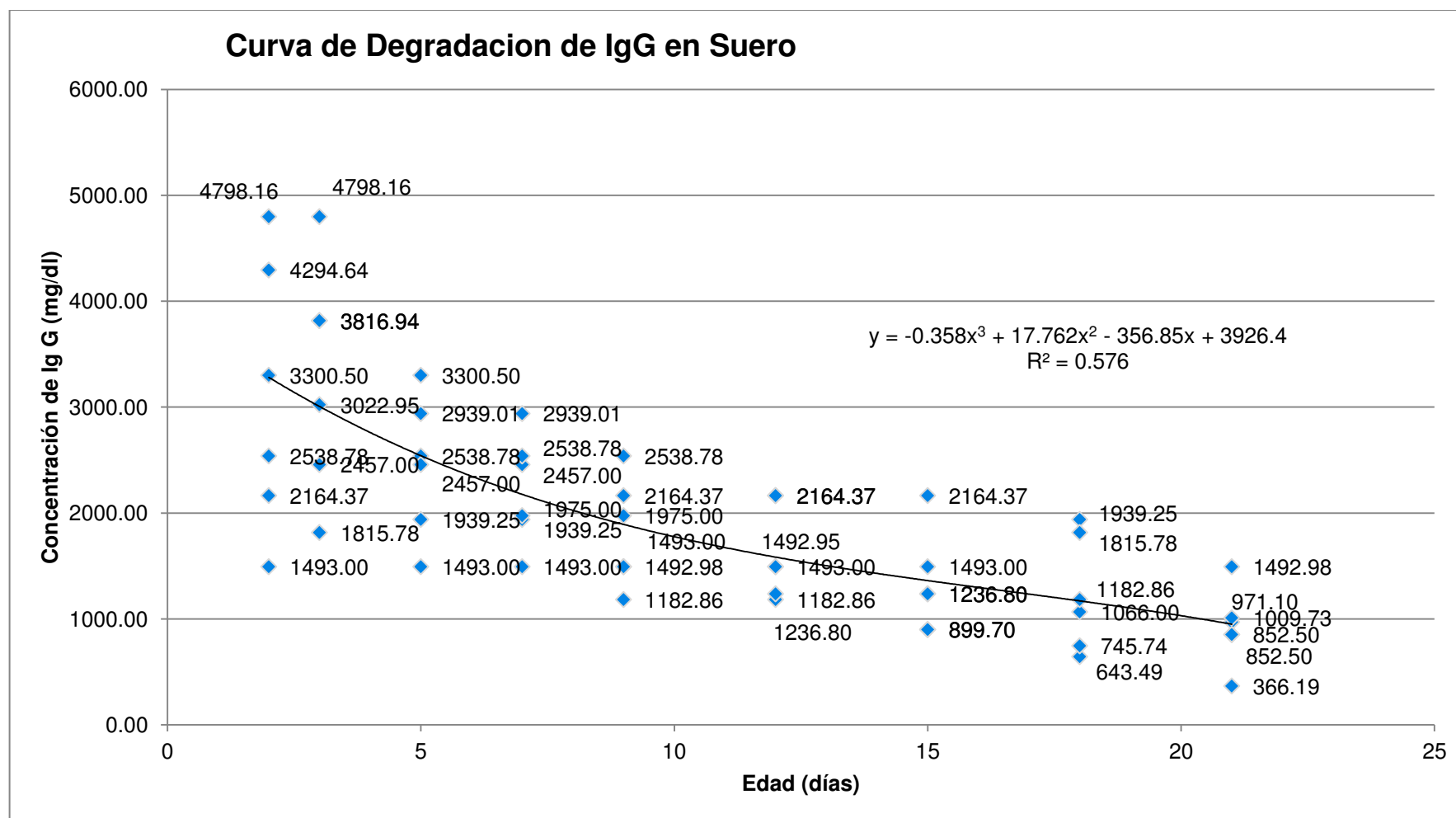


Figura N° 8. Curva de dispersión de las concentraciones de IgG en 6 crías de alpacas desde los dos hasta los 21 días de edad. Los puntos azules indican las concentraciones séricas de igG mencionadas en el cuadro 3 en un gráfico de dispersión, formando una curva con su respectiva ecuación.

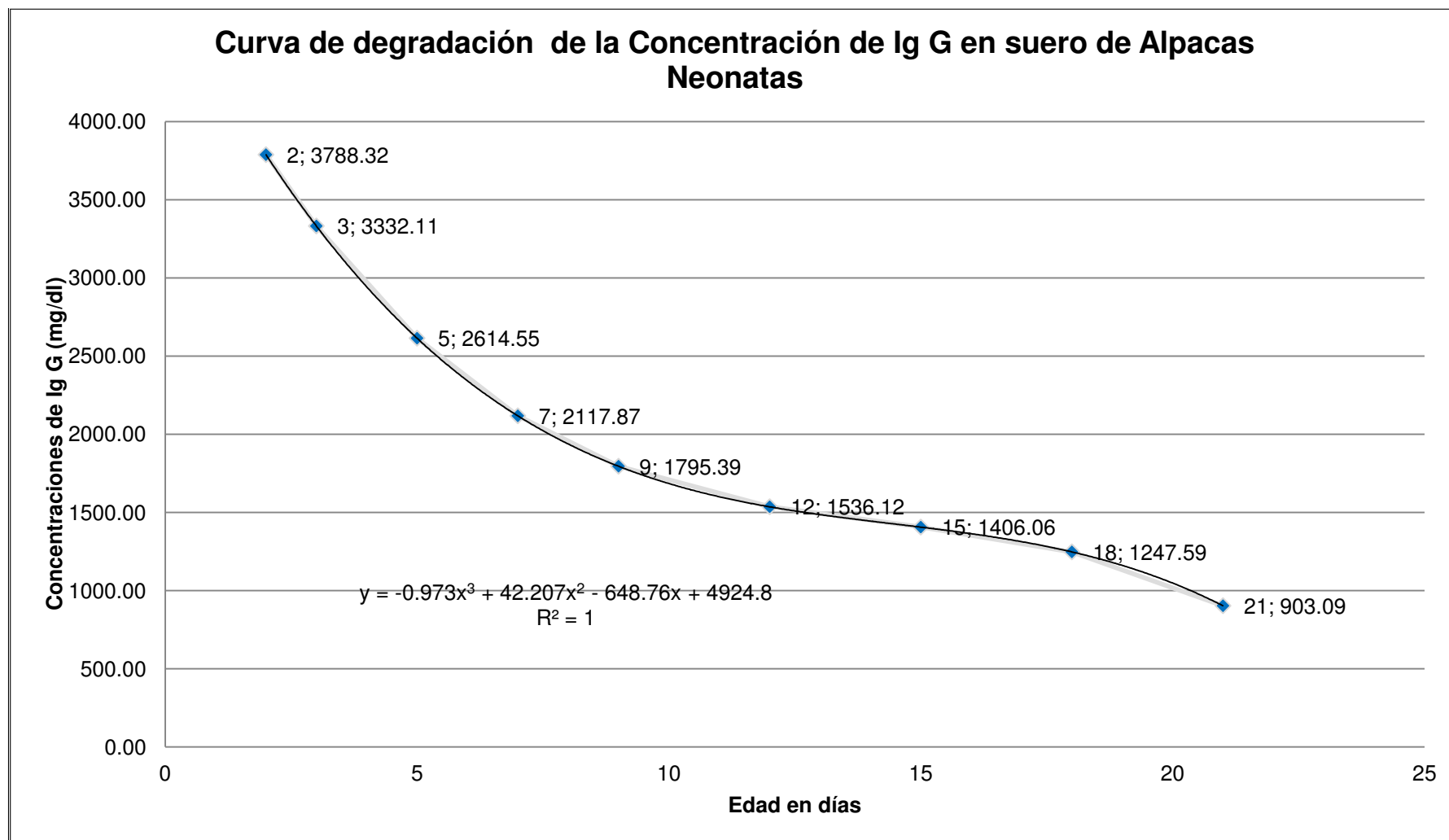


Figura 9. Curva de Degradación de la Concentración de Ig G en suero de Alpacas Neonatas mostrando concentraciones de Ig G por días de edad, basado en la ecuación obtenida en la figura 8.

## **2. Fase II: Casos y Controles**

Se obtuvieron 17 casos (Muertos por Enterotoxemia), como se pueden observar en el cuadro 4, considerando animales mayores a los 5 días de nacido ya que según Ameghino y De Martini (1991) consideran que las causas de mortalidad en neonatos en los primeros 4 días no incluyen las enfermedades infecciosas. Por parte de los controles se tuvo en consideración animales a partir de los 5 días de edad con el mismo criterio que se tuvo con los animales casos. El total de muestras seleccionadas fue de 25 controles, que se muestran en el cuadro 5.

La determinar los probables casos positivos de FTP tanto en los animales muertos por Enterotoxemia (Casos) y en los animales sanos (Controles), se tomó como referencia las concentraciones obtenida con la ecuación de la curva previamente formada en la primera fase del estudio a lo largo de los primeros 21 días, que indica la cinética de degradación de IgG en animales aparentemente sanos. Los niveles de concentración de IgG animales Casos y Controles de esta segunda fase del estudio fueron comparados con las concentraciones determinadas por la ecuación de la curva. Animales por debajo de los valores establecidos por la ecuación fueron considerados como casos positivos (+) de FTP parcial.



Cuadro 4. Grupo Casos (Enterotoxemia positivo), donde se observan la edad, código de muestra, lugar de muestreo, el año de muestreo, el número de diámetro en placa y concentración de IgG.

	<b>Cod. laboratorio</b>	<b>Edad En días</b>	<b>lugar</b>	<b>año muestreo</b>	<b>Diámetro</b>	<b>Concentración</b>	<b>FTP</b>
					mm	mg/dL	
<b>1</b>	A-1	10	Imata	2007	5	1119.39	(+)
<b>2</b>	L06	14	UNA-PUNO	2008	5.5	1493.01	(-)
<b>3</b>	L08	21	UNA-PUNO	2008	5	1119.39	(-)
<b>4</b>	L09	14		2008	6	1936.44	(-)
<b>5</b>	L10	17	UNA-PUNO	2008	6	1936.44	(-)
<b>6</b>	L13	7	UNA-PUNO	2008	9	5406.84	(-)
<b>7</b>	L14	14	UNA-PUNO	2008	7	2939.00	(-)
<b>8</b>	L17	21	UNA-PUNO	2008	6.5	2418.44	(-)
<b>9</b>	L15	14	UNA-PUNO	2008	9	5406.84	(-)
<b>10</b>	L-19	14	UNA-PUNO	2008	6	1493.00	(-)
<b>11</b>	S-L3	20	Choroma	2009	6.5	1667.19	(-)
<b>12</b>	S-L5	5	Choroma	2009	6.5	1667.19	(+)
<b>13</b>	U5	17	UNSAAC	2009	5.5	1182.86	(-)
<b>14</b>	U6	14	UNSAAC	2009	5	899.70	(+)
<b>15</b>	M-11	12	UNA-PUNO	2010	8	3492.35	(-)
<b>16</b>	M17	21	UNA-PUNO	2010	8	3492.35	(-)
<b>17</b>	M16	23	UNA-PUNO	2010	5	899.70	(-)

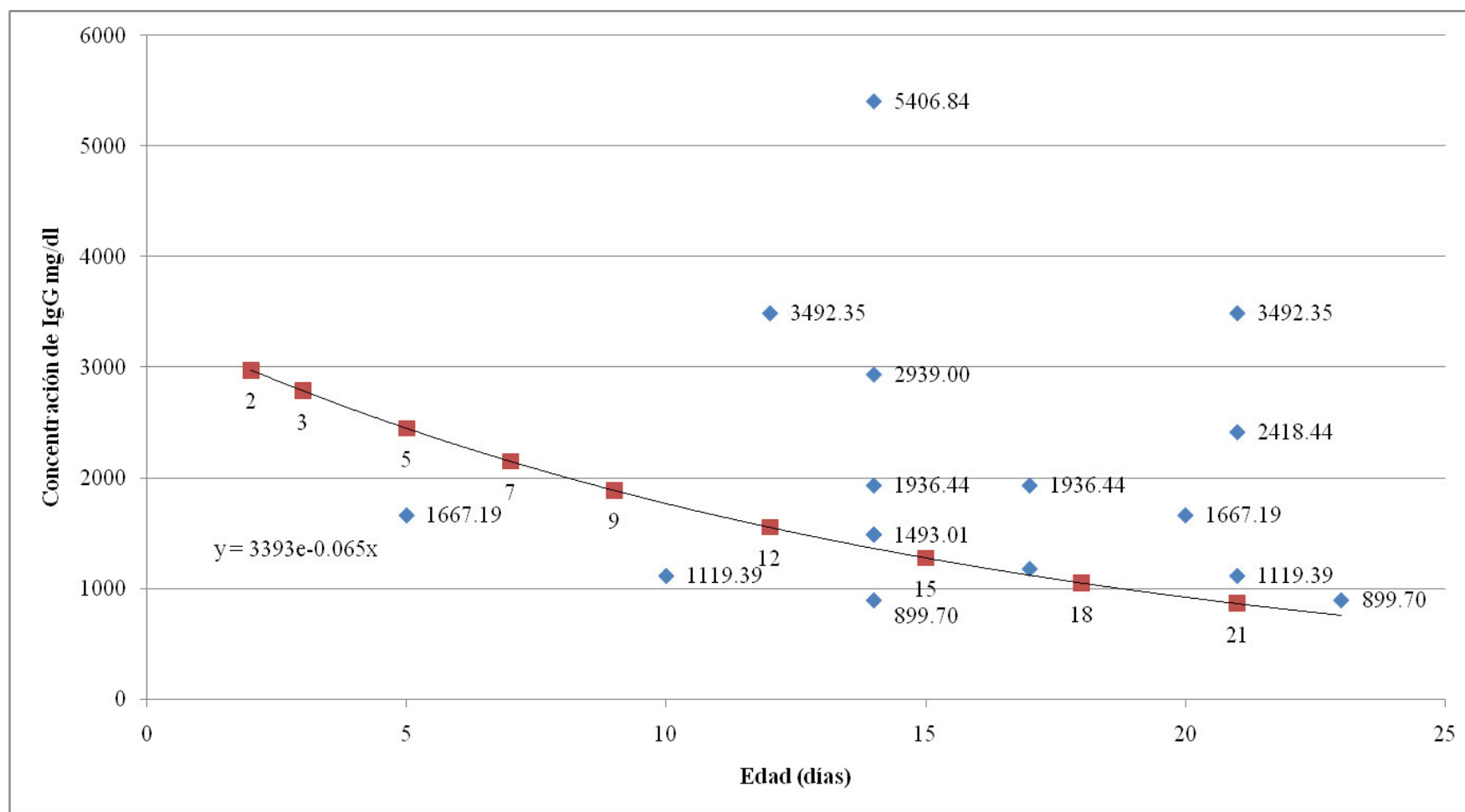


Figura 10. Animales Casos (Muertos por enterotoxemia) confrontados con la Curva de Degradación de IgG en suero de alpacas neonatas por día de edad. Las muestras del grupo Casos (17) son mostradas como puntos azules en el gráfico de dispersión, nótese que hay tres puntos que se encuentran por debajo de la curva, siendo considerados casos de FTP parcial, los números al lado derecho de los puntos azules indican las concentraciones de IgG en mg/dL.

Cuadro 5. Grupo controles (Sanos), donde se observan la edad, código de muestra, lugar de muestreo, el año de muestreo, el número de diámetro en placa y concentración de IgG.

	<b>Código</b>	<b>Edad</b>		<b>año</b>	<b>Diámetro</b>	<b>Concentración</b>	
	<b>laboratorio</b>	<b>En</b>	<b>lugar</b>	<b>muestreo</b>	<b>mm</b>	<b>mg/dL</b>	<b>FTP</b>
		<b>días</b>					
<b>1</b>	C3	22	UNA-PUNO	2010	5	899.70	(-)
<b>2</b>	C5	20	UNA-PUNO	2010	5.2	1009.73	(-)
<b>3</b>	C8	22	UNA-PUNO	2010	5.7	1303.68	(-)
<b>4</b>	C10	18	UNA-PUNO	2010	7	2421.24	(-)
<b>5</b>	C12	21	UNA-PUNO	2010	7	2421.24	(-)
<b>6</b>	C13	17	UNA-PUNO	2010	7	2421.24	(-)
<b>7</b>	C20	22	UNA-PUNO	2010	5.7	1303.68	(-)
<b>8</b>	C26	21	UNA-PUNO	2010	8.5	4081.46	(-)
<b>9</b>	C29	13	UNA-PUNO	2010	6	1493.00	(-)
<b>10</b>	C30	19	UNA-PUNO	2010	5	899.70	(+)
<b>11</b>	C33	10	UNA-PUNO	2010	7.5	2423.77	(-)
<b>12</b>	C34	12	UNA-PUNO	2010	8	3487.50	(-)
<b>13</b>	C36	13	UNA-PUNO	2010	8	3487.50	(-)
<b>14</b>	C37	7	UNA-PUNO	2010	9	4069.22	(-)
<b>15</b>	C38	17	UNA-PUNO	2010	7	1941.77	(-)
<b>16</b>	C39	7	UNA-PUNO	2010	9	4069.22	(-)
<b>17</b>	C41	13	UNA-PUNO	2010	8.5	3487.50	(-)
<b>18</b>	C42	11	UNA-PUNO	2010	8	3487.50	(-)
<b>19</b>	C44	14	UNA-PUNO	2010	7	1941.77	(-)
<b>20</b>	C46	17	UNA-PUNO	2010	7	1941.77	(-)
<b>21</b>	C47	17	UNA-PUNO	2010	6	1226.12	(-)
<b>22</b>	C48	14	UNA-PUNO	2010	9	4069.22	(-)
<b>23</b>	C49	13	UNA-PUNO	2010	7	1941.77	(-)
<b>24</b>	C50	16	UNA-PUNO	2010	8	3487.50	(-)
<b>25</b>	C51	14	UNA-PUNO	2010	8.8	3832.54	(-)
<b>26</b>	C52	21	UNA-PUNO	2010	6	1226.12	(-)

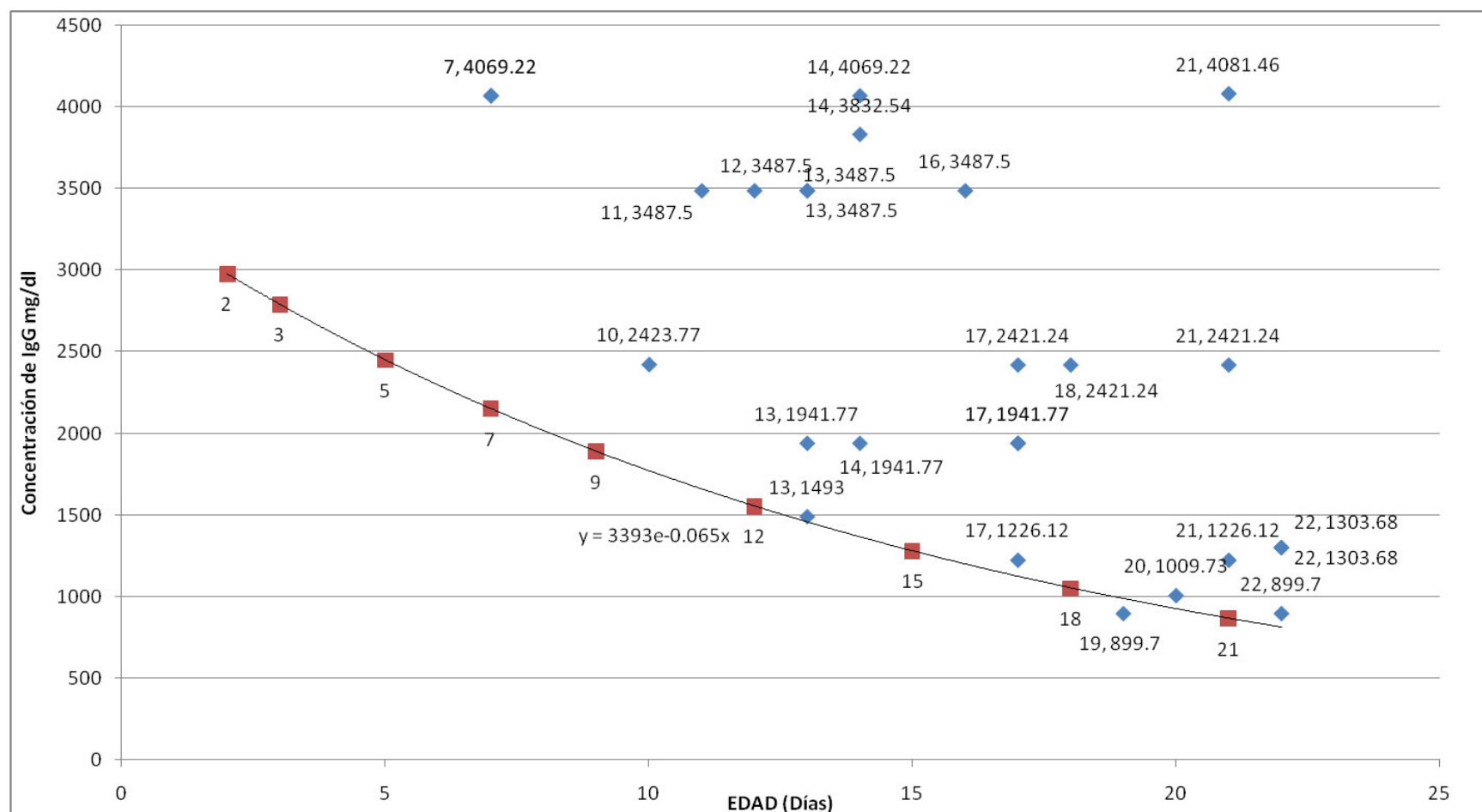


Figura 11. Animales control (animales sobrevivientes a brotes de enterotoxemia) enfrentados con la Curva de Degradación de IgG en suero de alpacas neonatas por día de edad. Las muestras del grupo control (26) son mostrados como puntos azules en el gráfico de dispersión, nótese que solo hay un punto por debajo de la curva, siendo considerado caso de FTP parcial, los números al lado derecho de los puntos azules indican primero la edad en días seguido de las concentraciones de IgG en mg/dL.

## 2.1 Fase Final: Determinación de la asociación entre FTP y Enterotoxemia

El Cuadro 8 muestra la distribución de los animales casos y controles en una matriz 2 x 2 para estimar el Odds Ratio (OR), en base al número de animales que presenten FTP en ambos grupos, quedando en los animales casos un 3/17 del total, y un 1/26 del total de animales controles, quedando el cuadro como sigue:

Cuadro 6. Los resultados siendo enfrentados en el cuadro para su posterior análisis estadístico mediante Odds Ratio.

	<b>Muertos por Enterotoxemia (+)</b>	<b>Sanos en Brote Enterotoxemia (-)</b>	<b>total</b>
<b>FTP (+)</b>	3	1	4
<b>FTP (-)</b>	14	25	39
<b>total</b>	17	26	43

- $a = 3$
- $b = 1$
- $c = 14$
- $d = 25$

Donde el OR va a ser igual a  $(axd)/(cxb)$

$$(3 \times 25) / (14 \times 1) = 5.357142857$$

Lo que indica el Odds Ratio es que el riesgo de presentar cuadros de enterotoxemia en animales con FTP es 5 veces mayor que los animales que hayan absorbido niveles adecuados de IgG calostrales al nacer.

El intervalo de confianza al 95% del OR es el siguiente:

$$IC = (OR) \exp (\pm 1.96\sqrt{1/a + 1/b + 1/c + 1/d})$$

Realizando el cálculo el IC oscila entre **0.5015942** y **57.21552833**.

## V. DISCUSION

El presente estudio tuvo la finalidad de dilucidar la relación o asociación entre la presencia de FTP y la mortalidad por enterotoxemia en alpacas neonatas, una de las enfermedades de mayor repercusión en la producción alpaquera peruana, con una mortalidad que supera el 50% y que puede llegar hasta el 70% (Ramírez *et al.*, 1985).

En la primera fase del proyecto, los resultados del análisis de las muestras de las seis crías sirvieron para obtener una curva de degradación de IgG a partir de las 48 horas después del nacimiento hasta los 21 días de edad. La construcción de esta curva corrobora lo encontrado por los estudios previos de Weaver, *et al.* (2000b), y Bravo *et al.* (1997). Al tratar de obtener la ecuación de la curva se concluyó que una regresión exponencial muestra un mejor acercamiento a lo que la literatura indica. Debido a ello se tomó en consideración realizar una regresión exponencial, el cual nos mostró un mejor  $R^2$  llegando a 0.6082 con una ecuación resultando:

$$Y = 3393e^{-0.065x}$$

Todos los animales tenían en las primeras 48 horas de edad distintas concentraciones que fluctuaban desde 1493 a 4798 mg/dl de IgG en suero hasta alcanzar niveles inferiores a 1000 mg/dl a los 21 días de edad, mucho antes según el estudio de Bravo *et al.* (1997), donde las concentraciones séricas de sus crías llegaban a niveles inferiores a 1000 mg/dl a los 28 días de edad. Esta parte del estudio también muestra que un animal (Cría 3) tenía concentraciones de IgG por debajo del resto de las concentraciones de los otros animales, lo que indica que este animal sufrió de FTP parcial, representando el 16.67% del total de animales, semejante a otros estudios relacionados (Garnica y Bravo, 2001; Weaver *et al.*, 2000a), pero mayor al 9% de FTP reportado por Garmendia *et al.* (1986) y Bravo *et al.* (1997). Esta diferencia con Garmendia *et al.* (1986) y Bravo *et al.* (1997) probablemente sea por número de muestras utilizado en su estudio (82 y 450 animales respectivamente). Por otro lado, Garnica y Bravo (2001) y Weaver *et al.* (2000a) trabajaron con 40 y 30 crías respectivamente y probablemente se deba a ello la semejanza de porcentajes.

También observamos que los valores de concentraciones de IgG al día 2 estaban en un rango de valores entre 1493 a 4798 mg/dl, ligeramente por encima de los valores que obtuvieron Weaver *et al.* (2000a y 2000b), los cuales oscilaron desde 0 a 4,425 mg/dl; como también con Bravo *et al.* (1997) los cuales oscilaron entre los 1644 a 4500 mg/dl. Se pudo observar que el 66.67% (4/6) de animales de esta primera fase del estudio elevaron sus concentraciones de IgG séricas del día dos al día tres de edad. Esto puede inferir que probablemente la absorción a nivel intestinal no se cierra totalmente a las 48 horas de nacido (Bravo *et al.*, 1997; Garnica y Bravo, 2001), y en algunos casos requiere de un mayor tiempo de absorción para obtener un adecuado nivel de IgG calostroal o de un mecanismo de retroalimentación tal como lo sugiere Flodr *et al.* (2012). A pesar del reducido número de muestras, nos puede dar indicios de que posiblemente suceda este evento.

Para la segunda fase del estudio, la selección de animales que fueron evaluados, tanto en animales muertos por enterotoxemia (Casos) como en



animales sanos procedentes de zonas con brote de enterotoxemia (controles), determinó un total de 17 animales casos y 26 controles. Para determinar individuos con Falla de Transferencia Pasiva (FTP), se tomó el criterio que Weaver *et al.* (2000b) y Garmendia *et al.* (1986) establecieron sobre FTP, que indica a los animales con concentraciones de IgG menores o iguales a 900mg/dL a las 48 horas de vida como FTP positivos. Debido a que no hay seguimiento de los animales a partir de los 2 días de edad, no se podría determinar FTP, por ello, para finalidad del estudio, se determinó el estatus inmunológico de los animales casos y controles confrontando sus valores de concentraciones de cada muestra frente a los valores que proporcionaba la ecuación de cinética de IgG previamente formada en la primera fase del estudio, estableciéndose que valores por debajo de la curva indicaban un estatus inmunológico inadecuado y reseñas de una probable FTP parcial, marcando la muestra como positiva a FTP. Con ese referente se obtuvo 3/17 animales positivos en el grupo Casos, y 1/26 animales positivos en el grupo Control. Los resultados de la segunda fase del estudio también indican que los animales que padecieron enterotoxemia tenían concentraciones mayores de lo estipulado para ser considerado como FTP, pues exceptuando uno de ellos, todos tuvieron concentraciones superiores a los 900 mg/dL (Garmendia *et al.*, 1986) y 1000 mg/dL (Weaver *et al.*, 2000b). En el grupo de enfermos se pudo observar que las concentraciones de IgG en 14 de 17 animales (Figura 10) que a pesar de estar por encima de la curva, sus concentraciones no son muy elevadas. En contraste con las concentraciones de los animales del grupo control (Figura 11), donde gran parte de los animales muestran concentraciones muy por encima de lo normal. Esta diferencia quizás se deba a un mayor consumo de Igs de los animales enfermos combatiendo infecciones bacterianas.

Por último, los datos finales fueron enfrentados en una matriz 2 x 2 para estimar el Odds Ratio, y así poder determinar el nivel de asociación, el cual resultó en **5.357142857** con un intervalo de confianza que oscila entre **0.5015942** y **57.21552833**, indicando que la posible asociación no existe ya

que no es estadísticamente significativo, indicando que el evento solo sería producto del azar.

Este resultado nos indica que no hay una relación entre FTP y mortalidad en alpacas neonatas por enterotoxemia, la mayoría de individuos tienen niveles de IgG que podrían conferirle protección, según Garmendia *et al.* (1986) la mayor mortalidad se presenta en individuos con niveles menores a los 900 mg/dl a las 48 horas de nacido, siendo las enfermedades neumónicas o asociaciones entre neumonías y enteritis como las de mayor importancia, mientras que los problemas entéricos solo correspondieron al 14% del total de mortalidad. Por otro lado, el hecho de contar con un tamaño de muestras pequeño, fallas técnicas al momento de realizar el estudio u otros quizás sean las determinantes del porqué de los resultados.

## **VI. CONCLUSIONES**

- 1.** Se confirma una cinética de degradación de IgG en alpacas neonatas, además de la conformación de una ecuación teórica para dicha curva.
- 2.** La evidencia de una prolongación en el tiempo de la absorción de IgG a nivel intestinal en alpacas neonatas más allá de las 48 horas de nacido.
- 3.** Un 16.6% que indica FTP parcial en animales neonatos.
- 4.** La concentración de IgG en la etapa neonatal no representa un Factor de Riesgo significativo para la presentación de enterotoxemia en Alpacas Neonatas.

## **VII. RECOMENDACIONES**

- 1.** Realizar un estudio más minucioso sobre el tiempo de absorción de IgG calostrual, con un numero de muestras considerable, para dilucidar sobre la cinética de degradación de IgG y establecer valores reales sobre FTP en alpacas neonatas.
- 2.** La posible no asociación entre FTP y mortalidad por enterotoxemia debe ser corroborada en un estudio que involucre un mayor número muestral para confirmar los resultados hallados.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Ameghino E, De Martini J. 1991.** Mortalidad de crías de alpacas. Boletín de Divulgación del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA). UNMSM. Lima, Perú. 128p.
2. **Arias W, Sandoval N, Chavera A, Manchego A. 2011.** Caracterización de la Citoarquitectura Explénica fetal en Alpacas (*Lama pacos*). *Rev Inv Vet Peru* 22(2): 81-88.
3. **Baintner K. 2007.** Transmission of antibody from mother to Young: Evolutionary strategies in a proteolytic environment. Elsevier, *Veterinary Immunology an Immunopathology* 117. 153-161.
4. **Barach JT, Adams DM, Speck ML. 1974.** Recovery of heat *Clostridium perfringens* type A spores on selective media. *Appl Microbiol* 28: 793-797.
5. **Bravo W, Garnica J, Fowler M. 1997.** Immunoglobulin G concentration in periparturient llamas, alpacas and their crias. *Small Ruminant Research* 26: 145-149.
6. **Bustinza AV, Burfening PJ, Blackwell RL. 1988.** Factors affecting survival in young alpacas (*Lama pacos*). *J Anim Sci* 66: 1139-1143.
7. **Cruickshank R, 1965.** Medical microbiology. 11va ed. P 208-216. E. & S. Livingstone Limited. Great Britain.
8. **Davis R, Keeble E, Wright A, Morgan KL. 1998.** South American camelids in the United Kingdom: population statistics, mortality rates and causes of death. *Vet Res* 142: 162-166.
9. **Daley-Bauer LP, Purdy SR, Smith MC, Gagliardo LF, Davis WC, Appleton JA. 2010.** Contribution of Conventional and Heavy-Chain IgG to Immunity in Fetal, Neonatal and Adult Alpaca. *Clin Vaccine Immunol* 17(12):2007. DOI: 10.1128/CVI.00287-10. Journals.ASM.org.
10. **De Genst E, Saerens D, Muyldermans S, Conrath K. 2006.** Antibody repertoire Development in camelids. *Dev Com Immunol* 30:187–198.
11. **Dushesnes C, Mainil J. 2005.** Genus *Clostridium*. Scientific Booklets European Action QLK2-CT2001-01267. Disponible en: <http://www.genusclostridium.net>.

- 12. Ellis RP, 2006.** *Clostridium perfringens* enteritis. En: The complete alpaca book. P 464-467. E. Hoffman (ed). 2da ed. Bonny Doun Press. California.
- 13. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación). 2005.** Situación Actual de los Camélidos Sudamericanos en el Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914.
- 14. FIA. 2000.** Camélidos en Chile: situación actual y perspectivas. Fundación para la Innovación Agraria. Ed: Gobierno de Chile, Santiago, Chile, 130 p.
- 15. Flodr H, Wheeler J, Krüger P, Olazabal L, Rosadio R.** Pruebas de campo para evaluar calidad calostrual en Alpaca. *Rev Inv Vet Perú* 23(3): 307-316.
- 16. Fowler ME, Olander HJ. 1990.** Fetal membranes and ancillary structures of llamas (*Lama glama*). *Am. J. Vet. Res.* (51), 1495-1500.
- 17. Fowler M, 1998.** Medicine and Surgery of South American camelids. Feeding and Nutrition. Chap. 2. Iowa State University Press/ AMES. Iowa, USA. 391 p.
- 18. Garmendia A, Palmer G, De Martini J, McGuire T. 1986.** Failure of passive immunoglobulin transfer: A major determinant of mortality in newborn alpacas (lama pacos). *Am J Vet Res* Vol 48, Nº 10.
- 19. Garmendia A y McGuire T. 1986.** Mechanism and isotypes involved in passive immunoglobulin transfer to the newborn alpaca (lama pacos). *Am J Vet Res* Vol 48, Nº 10.
- 20. Garnica J, Bravo W. 2001.** Absorción de inmunoglobulina G calostrual en alpacas crías durante la vida perinatal. ALLPAK'A Revista de investigación sobre camélidos sudamericanos. Vol. 9 – Nº 1. Puno Perú.
- 21. Garnica J, Calsin E, Bravo W. 2003.** Uso de la inmunoglobulina G en la sobrevivencia de las alpacas crías. III Congreso Mundial de Camélidos y I Taller Internacional de DECAMA-Potosí, Bolivia.

- 22. Garrity GM, Winters M, Searles DB. 2001.** Taxonomic outline of the prokaryotic genera. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2da ed. P 1-41. U.S.A.
- 23. Gillespie J, Timoney J 1981.** Hagan and Bruner's infectious diseases of domestic animals. 7ma ed. P 207-211. International Standart. U.S.A.
- 24. Gijón MA, Spencer DM, Leslie CC. 2000.** Recent advances in regulation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. *Advan Enzyme Regul* 20: 255-268.
- 25. Hatheway C, 1990.** Toxigenic Clostridia. *Clin Microbiol* 3: 66-98.
- 26. Hunter AG, Reneau JK, Williams JB. 1977.** Factors affecting immunoglobulin G concentration in day-old lambs. *J Anim Sci* 45, 1146-1151.
- 27. Iturrizaga D, Verechia F, Santos T, Bombonato P, Teixeira D, Miglino M. (2007).** The materno fetal interface in llama (*Lama guanicoe glama*). *Pesq Vet Bras* 6 (27), 221- 228.
- 28. Jeffcott LB. 1971.** Perinatal studies in Equidae with special reference to passive transfer of immunity. PhD Thesis University of London, 90 pp.
- 29. Jocklik WK, Willett HP. 1991.** Zinsser Microbiología. Ed. Médica veterinaria. Buenos Aires. 20. pp 861-871.
- 30. Jorgensen D, 1991.** Llama immunoglobulin G (IgG) and it's role as an indicator of health status. Llama Life. Disponible en [www.kentlabs.com/articles\\_igghealth.htm](http://www.kentlabs.com/articles_igghealth.htm).
- 31. Jorgensen D, 1995.** How to Correct Abnormal IgG levels in Newborn Llamas. Published in "Llama Life," Kent Labs. Disponible en [www.kentlabs.com/articles\\_igghealth.htm](http://www.kentlabs.com/articles_igghealth.htm).
- 32. Kamber R, Farah Z, Rusch P, Hassig M. 2001.** Studies on the supply of immunoglobulins G to newborn camel calves (*Camelus dromedaries*). *J Dairy Res* 68:1–7.
- 33. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2001.** Biología de los microorganismos. 8va edición. P 725-727. Prentice Hall. España.
- 34. Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF, 1965.** Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2. 235-254.

- 35. Maturrano L, Yaya K, Veliz A, Castillo H, Wheeler J, Rosadio R. 2006.** Detección de genes codificantes de toxinas en cepas de *Clostridium perfringens* aisladas de enterotoxemia neonatal en alpacas. II Simposium Internacional de Investigaciones sobre camélidos sudamericanos, Arequipa.
- 36. Melo M, Medina G, Sánchez C, Condemayta Z, Soto A. 1999.** Influencia del manejo de un brote de enterotoxemia en crías de alpacas de la CE La Raya-UNA-Puno. Res. II Cong. Mun. sobre Camélidos. Cusco, Perú. P 138.
- 37. Merchant IA, Packer RA. 1961.** Veterinary bacteriology and virology. 6ta ed. P 492-493, 505-509. Library of Congress Catalog Card. Iowa.
- 38. Montenegro J, Sandoval N, Chavea A, Manchego S. 2006.** Caracterización Histológica del Timo en Fetos de Alpaca. *Rev Inv Vet Peru* 17(1): 26-32.
- 39. Moro M, 1971.** Enfermedades infecciosas de las alpacas. Diarrea bacilar o enterotoxemia de las crías de alpacas. Boletín de Divulgación del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA) UNMSM. Lima, Perú. P 9-14.
- 40. Moro M, 1987.** Enfermedades infecciosas de las alpacas. Diarrea bacilar o enterotoxemia de las crías de las alpacas. *Rev Camélidos Sudamericanos*, lima 4: 8-13.
- 41. Nicolet J, 1986.** Compendio de bacteriología médica veterinaria. 1ra edición. P 146-160. Ed. Acribia S.A. España.
- 42. Oha R, 1994.** Anatomía patológica de las diarreas infecciosas en crías de alpaca (*Lama pacos*) en la SAIS Aricoma Ltda. 57. Tesis de Médico Veterinario y Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional del Altiplano, Puno. 79p.
- 43. Olivera L, Douglas Z, Leiser R, Jones C, Bevilacqua E. (2003).** Placentation in the alpaca *Lama pacos*. *Anat Embryol* (207), 45-62.
- 44. Palacios C, 2004.** Caracterización anatomopatológica de enteropatías causantes de mortalidad en crías de alpaca. Tesis de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria, UNMSM, Lima 164 p.



- 45. Palacios C, Perales R, Chavera A, López T, Braga W, Moro M. 2006.** *Eimeria Macusaniensis* and *Eimeria ivitaensis* co-infection in fatal cases of diarrhoea in Young alpacas (*Lama pacos*). *Peru Vet Rec* 158: 344-245.
- 46. Penhale WJ, Christie G. 1969.** Quantitative Studies on Bovine Immunoglobulins I. Adult plasma and colostrums levels. *Res Vet Sci* 10, 493-501.
- 47. Pérez D, 2005.** Genotipificación y subtipificación de *Clostridium perfringens* aislados en crías de alpacas muertas por enterotoxemia. Tesis pre grado FMV-UNMSM. Lima-Perú. 91p.
- 48. Pérez D. 2010.** Caracterización Toxigénica de la Fosfolipasa C del *Clostridium perfringens* y su relación con aislados de C. perfringens en casos de Enterotoxemia en alpacas. Tesis para optar el grado académico de Magister en Microbiología de la Unidad de Post Grado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM. Lima-Perú. 151p.
- 49. Petit L, Gilbert M, Popoff M. 1999.** *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol* 7:104-110.
- 50. Pezo D, Franco E, García W, Leyva V. 1999.** Evaluación de una solución de antibióticos (ampicilina + sulfato de colistina) y consumo de calostro en la prevención neonatales en crías de alpacas. Res. II Cong. Mun. sobre Camélidos. Cusco, Perú. P 139.
- 51. Prehn N, Saez S, Arraigada M. 1999.** Estudios microbiológicos y clínicos de enterotoxemia por *Clostridium perfringens* en camélidos sudamericanos. Res. II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco, Perú. P140.
- 52. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FL. 2005.** Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. 1ra ed. P 101-114. Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España.
- 53. Quispe W, 2009.** Determinación del tiempo de producción de IgG en crías de alpacas. Tesis para optar por el Título Profesional. Universidad Jorge Basadre-Tacna.
- 54. Ramírez A, Huamán D, Ellis RP. 1985.** Enterotoxemia de la alpaca. Programa colaborativo de apoyo a la investigación en rumiantes menores. Serie reporte técnico, Lima 63: 1-17.

- 55. Ramírez A, 1987.** Alpaca *Clostridium perfringens* type A enterotoxemia: Purification and assays of the enterotoxin. In partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy. Colorado State University. Colorado. 201p.
- 56. Ramírez A, 1988.** Avances de la Investigación sobre enteritis e inmunidad neonatal en la alpaca. Curso taller "Resultados de la investigación del programa de rumiantes menores (1980-1989). Programa colaborativo de apoyo a la investigación en rumiantes menores. Arequipa. P 153-163.
- 57. Ramírez A, Ellis R. 1988.** Nuevos conceptos sobre la enterotoxemia y colibacilosis en alpacas. Rev. Camélidos Sudamericanos, Lima 6: 9-17.
- 58. Ramírez A, 1989a.** Avances de la Investigación sobre enteritis e inmunidad neonatal en la alpaca. Curso taller "Resultados de la investigación del programa de rumiantes menores (1980-1989). Programa colaborativo de apoyo a la investigación en rumiantes menores. Riobamba. P183-191.
- 59. Ramírez A, 1989b.** Enfermedades infecciosas en camélidos sudamericanos. XII Reunión Científica Anual APPA. Simposio de Producción de alpacas y llamas. FMV-UNMSM, Lima p 85-101
- 60. Ramírez A, 1990.** Aplicación de la enterotoxina de *Clostridium perfringens* tipo A en el diagnóstico y control de la enterotoxemia en camélidos sudamericanos. Avances sobre investigación en salud animal CSA. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Div. 33: 11-24.
- 61. Ramírez A, Franco E, Pezo D, García W. 1998.** Diagnóstico y control de enfermedades en CSA. *Pub Tec FMV* 43: 9-14.
- 62. Rea DE, Tyler JW, Hancock DD. (1996).** Prediction of calf mortality by use of test for passive transfer of colostral immunoglobulin. *J Am Vet Med* 15;208(12):2047-9.
- 63. Redman DR. (1979).** Prenatal Influence on Immunocompetence of the neonate. *J Anim Sci* 49 (1), 258-267.
- 64. Rivera CA, Ramírez A. 1999.** Dinámica de excreción de *E. coli* y enterotoxina de *C. perfringens* asociado a pH fecal en neonatas de

- alpaca (0-30 días). Res. II Cong. Mun. Sobre camélidos. Cusco, Perú. P 134.
- 65.Rood J, Cole S. 1991.** Molecular Genetics and pathogenesis of *Clostridium Perfringens*. Microbiol. Rev. 55: 621-648.
  - 66.Rood J, 1988.** Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Annu Rev microbial* 52: 333-360.
  - 67.Roopenian DC, Akilesh S. 2007.** FcRn: The Neonatal Fc Receptor comes of age. *Nat Rev immunol* 7(9): 715-25.
  - 68.Rosadio R, Maturrano L. 2008.** Enterotoxemia: new evidence on pathogenesis prevention of the number one cause of neonatal alpaca mortality in South America in: proceeding of the world Alpaca conference.
  - 69.Rosadio R, Maturrano L, Pérez D, Castillo H, Véliz A, Luna L, Yaya K, Londoño P. 2012.** Avances en el estudio de la patogénesis y prevención de la enterotoxemia en alpacas. *Rev Inv Vet* 23 (3): 251-260.
  - 70.Rosadio R, Londoño P, Pérez D, Castillo H. 2009.** Eimeria macusaniensis associated lesion in neonate alpacas dying from enterotoxemia. ElSevier, *Vet Parasitol* 168 (1–2): pp 116–120.
  - 71.Sharpe MS, Lord LK, Wittum TE, Anderson DE. 2009.** Pre-weaning morbidity and mortality of llamas and alpacas. *Aust Vet J* 87: 56-60.
  - 72.Smedley JG, Fisher DJ, Sayeed S, Chakrabarti G, McClane BA. 2004.** The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 152: 183-204.
  - 73.Smith B, 1990.** Colostrum. Immunoglobulin absorption in the llama. January. Llama.
  - 74.Solís R, 1997.** Producción de camélidos sudamericanos. 1ra edición. P 230-232. Imprenta Rios. Pasco.
  - 75.Songer JG, 1996.** Clostridial enteric diseases of domestic animals. Clin. Microbiol. Rev. 9: 216-234.
  - 76.Songer JG, 1997.** Bacterial Phospholipases and their role in virulence. Trends microbial. 5: 156-161.
  - 77.Steven DH, Burton GJ, Sumar J, Nathanielsz PW. 1980.** Ultrastructural observations on the placenta of the alpaca (*Lama pacos*) *Placenta*, 1, 121-132.

- 78. Titball RW, Naylor CE, Basak AK. 1999.** The *Clostridium perfringens*  $\alpha$ -toxin. *Anaerobe* 5: 51-64.
- 79. Tizard I, 2009. Inmunología veterinaria.** Versión en Español de la Octava edición en inglés. Editorial Elsevier. 592p.
- 80. Weaver D, 1999.** Passive Transfer of Colostral Immunoglobulin G in New World Camelidae. MS thesis, Department of Veterinary Medicine and Surgery, University of Missouri, Columbia.
- 81. Weaver D, Tyler JW, Marion RS, Wallace LM, Nagy J, Holle J. 2000a.** Evaluation of assays for determination of passive transfer status in neonatal llamas and alpacas. *JAVMA*, Vol 216, N° 4. February 15, 2000.
- 82. Weaver D, Tyler JW, Scout MA, Wallace LM, Marion RS, Holle J. 2000b.** Passive transfer of Colostral immunoglobulin G in neonatal llamas and alpacas. *AJVR*, Vol 61, N° 7.
- 83. Wernery U, 2001.** Camelid immunoglobulin and their important for the new-born – a review *J Vet Med B* 48:561-568.
- 84. Wheeler CJ. 1995.** Evolution and present situation of the South American Camelidae. *Biol. J. Linnean Soc.* 54, 271–295.
- 85. Wright A, Davis R, Keeble E, Morgan KL. 1998.** South American camelids in the United Kingdom: reproductive failure, pregnancy diagnosis and neonatal care. 142: 214-215.
- 86. Yaya K, Rosadio R. 2005.** Ensayo de tres programas de vacunación anticlostridial en alpacas. *Rev. Inv. Vet. Perú* 16: 49-55.
- 87. Zavaleta A, Yaya K, Solano G, Rosadio R. 2004.** Genotipificación de cepas de *Clostridium perfringens* responsables de brotes de enterotoxemia en alpacas de la sierra sur del Perú. Libro de Resúmenes del IX Congreso de Ciencias Farmacéuticas. Lima – Perú.

## IX. ANEXOS

Anexo N°1. Valores de las concentraciones de IgG en los animales desde el día 2 hasta el 21 de edad, con el promedio final del grupo, Media, Desviación Estándar (DS), Intervalo de Confianza (IC) y Error estándar.

Días	2	3	5	7	9	12	15	18	21
cría 1	4294.64	3022.95	1939.25	1939.25	1492.98	1492.95	899.70	643.49	366.19
cría 2	2164.37	3816.94	3300.50	2939.01	2538.78	2164.37	2164.37	1939.25	1492.98
cría 3	1493.00	1815.78	1493.00	1493.00	1182.86	1182.86	899.70	745.74	971.10
cría 4	2538.78	2457.00	2538.78	1975.00	1493.00	1236.80	1236.80	1066.00	852.50
cría 5	3300.50	3816.94	2457.00	2457.00	1975.00	1493.00	1236.80	1815.78	852.50
cría 6	4798.16	4798.16	2939.01	2538.78	2164.37	2164.37	1493.00	1182.86	1009.73
MEDIA	3098.24	3287.96	2444.59	2223.67	1807.83	1622.39	1321.73	1232.19	924.17
DS	1274.67	1074.09	655.28	518.09	505.61	438.83	471.17	539.21	361.85
IC	1019.93	859.44	524.32	414.55	404.56	351.13	377.01	431.45	289.54
Error ST	520.38	438.50	267.52	211.51	206.41	179.15	192.36	220.13	147.73